

Über die Bestimmung
von verschiedenen Enzymen
des energieliefernden Stoffwechsels
im Epithel und Endothel der Cornea

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Hans-Dietrich Hildebrandt

aus Presberg/Rheingau

Marburg 1968

Über die Bestimmung
von verschiedenen Enzymen
des energieliefernden Stoffwechsels
im Epithel und Endothel der Cornea

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Hans-Dietrich Hildebrandt

aus Presberg/Rheingau

Marburg 1968

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am : 29.1.1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan : Prof. Dr.med. R. Siegert
Referent : Doz. Dr.med. M. Reim
Coreferent: Prof. Dr.med. W. Straub

I.	Aus der Literatur über Aufbau und Stoffwechsel der Hornhaut	
1.	Mikroskopischer und ultramikroskopischer Aufbau	1
a.	Epithel	1
b.	Stroma	2
c.	Endothel	3
2.	Bedeutung der Zellstrukturen und des zytoplasmatischen Raumes als Träger der Enzyme	3
3.	Enzymaktivitäten der Cornea aus der Lit.	4
4.	Bedeutung des energieliefernden Stoffwechsels für die Hornhaut	5
II.	Fragestellung und Plan der eigenen Untersuchungen	10
III.	Methoden	
1.	Gewinnung der Extrakte	11
a.	Gewinnung des Gewebes	11
b.	Präparation von Hornhautepithel und Endothel	11
c.	Gewichte von Hornhautepithel und Endothel der verschiedenen Spezies	12
d.	Extraktion der Enzyme	13
2.	Testmethoden	13
a.	Geräte und Reagentien	13
b.	Testvorschriften	14
c.	Auswertung der Messungen	21
3.	Kinetische Untersuchungen zur Bestimmung der Substratoptima und Michaelis-Konstanten	21
4.	Bestimmung des Proteingehaltes der Gewebe	25
IV.	Ergebnisse	
1.	Enzymaktivitäten im Hornhautepithel der verschiedenen Spezies	27
a.	Kaninchen	27
b.	Schwein	28
c.	Mensch	29
d.	Tropfen von Kaninchenhornhäuten mit Bednisolon-trimethylacetat	34
2.	Enzymaktivitäten im Hornhautendothel der verschiedenen Spezies	36
a.	Schwein	36
b.	Kaninchen	37

3.	Einige Enzymaktivitäten der Schweinehornhaut bei verschiedenen Extraktionsbedingungen	38
a.	Extraktion in anderem Medium	38
b.	Messungen im "Gesamthomogenat"	41
c.	Homogenisieren mit Ultraturrax	43
d.	Messung particulärer und zytoplasmatischer Enzyme im Gesamthomogenat	44
V.	Diskussion Gegenüberstellung von Epithel und Endothel	
1.	Vergleich hinsichtlich der Aktivitäten	46
2.	Vergleich der Aktivitäten in Bezug auf die Ultrastruktur	51
3.	Vergleich hinsichtlich der Substratoptima und Michaelis-Konstanten	52
VI.	Zusammenfassung	53
VII.	Anhang Tabellen der Einzelwerte Literaturverzeichnis Abkürzungen	

I. Aus der Literatur über Aufbau und Stoffwechsel der Hornhaut

1. Mikroskopischer und ultramikroskopischer Aufbau

Über den anatomischen Aufbau der Hornhaut, die chemische Zusammensetzung ihrer Bausteine und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, sowie über die Stoffwechselvorgänge in ihren einzelnen Schichten sind verschiedene Darstellungen erschienen. (DAVSON; DUKE-ELDER und PERKINS; PIRIE und van HEYNINGEN; ROHEN)

Die Hornhaut setzt sich aus drei histologisch unterschiedenen Schichten zusammen: Epithel, Stroma und Endothel. Sie bilden eine funktionelle Einheit.

a. Epithel

Beim Menschen, sowie bei kleineren Versuchstieren, finden wir 5 bis 8 Zellschichten, während bei Schwein, Pferd und Rind mehr als 10 Lagen Epithelzellen zu finden sind. Die Zellen des Hornhautepithels sind nicht in allen Schichten gleichmäßig gebaut. Die Basalzellschicht besteht aus kubischen, zum Teil zylindrischen, die Intermediärzellschicht aus rundlichen und die Deckzellschicht aus flachen Zellen. Durch Desmosomen sind die Epithelzellen auf ihrer Unterlage, der Basalmembran auf dem Hornhautstroma und untereinander befestigt. Unter der Basalmembran liegt die Bowmannsche Membran. Das Cytoplasma der Basalzellen läßt sich stärker anfärben als das der Deckzellen, außerdem sind die Zellkerne in den Basalzellen kontrastreicher und stärker konturiert. (ROHEN; VIRCHOW) Elektronenmikroskopisch erkennt man im Plasma der Basalzellen gut ausgebildete Zellorganellen: Das Endoplasmatische Retikulum und zahlreiche Ribosomen füllen fast den ganzen Zellkörper aus. (JAKUS; TENG; PEDLER) Meist in der Umgebung der Zellkerne liegen die kleinen, aber reich gegliederten Mitochondrien. Der Golgi-Apparat ist gut entwickelt,

die Zellkerne enthalten viele Nucleoproteid - Partikel. In den oberflächlichen Zellen des Hornhautepithels fehlen Golgi - Apparat und Mitochondrien, nur spärliche Reste des Endoplasmatischen Retikulums bleiben erhalten, dahingegen sind diese Zellen reich an Tonofibrillen. In den Intermediärzellen, die den Übergang zwischen Basal - und Deckzellen darstellen, findet man die Organellen der Basalzellen und die Tonofibrillen der Deckzellen. Die Mitochondrien zeigen aber bereits Degenerationerscheinungen, gekennzeichnet durch intramitochondriale Vakuolen, Einrisse der Membranen und Auflösung der Cristae (JAKUS; RHODIN).

Daß die Basalzellen nach außen abgeschoben werden und in wenigen Tagen in Deckzellen übergehen, wurde durch autoradiographische Studien nachgewiesen (HANNA und O'BRIEN).

Verschiedene Autoren (PAU und CONARDS; TENG) beschrieben zwischen den Basalzellen die sog. sekretorischen Zellen, "secretory cells", einen Zelltyp, der mit Methylviolett besonders anfärbbar ist und elektronenmikroskopisch (TENG) einen auffallend stark entwickelten Golgi - Apparat sowie sehr viele Mitochondrien enthält.

b. Stroma

Das Stroma ist 8 bis 12 mal so dick wie das Epithel. Sein histologisches Bild wird von den Stromalamellen beherrscht, dazwischen liegen wenige langgestreckte flache Zellen verteilt. Die Stromazellen haben Ähnlichkeit mit Fibrocyten (VIRCHOW; ROHEN). Ihr Zytoplasma ist wenig differenziert. Ihre Ausläufer zeigen im Elektronenmikroskop keine scharfen Grenzen zur Interzellularsubstanz (PEDLER; KAYE und PAPPAS). Dieser Befund führte zu der Vermutung, daß die Stromalamellen von den Stromazellen synthetisiert und erneuert werden (JAKUS; SCHWARZ). Dafür sprechen auch Versuche von DELBRÜCK, der in isolierten Stromascheiben in vitro den Einbau von anorganischem

^{35}S in die Mukopolysaccharide nachweisen konnte. Das Epithel scheint aber an der Synthese der Interzellularsubstanz beteiligt zu sein. Denn PRAUS und OBENBERGER fanden, daß der Einbau von ^{35}S in die Mukopolysaccharide des Stromas in vitro wesentlich schneller vonstatten ging, wenn noch eine vollständige Epitheldecke vorhanden war.

Ein zweiter, weniger häufig vorkommender Zelltyp im Stroma sieht aus wie plattgedrückte polymorphkernige Leukozyten. Diese Zellen sind reich an Zellorganellen.

c. Endothel

Das Endothel der Hornhaut bildet in einer gleichmäßig gebauten einzelligen Schicht polygonaler Zellen die Grenze zum Kammerwasser. Ultramikroskopisch werden zahlreiche Mitochondrien sichtbar, sowie ein weitgehend differenziertes Endoplasmatisches Retikulum (KAYE; JAKUS; TENG; PEDLER). Durch das Endothel können zahlreiche Substanzen (MAURICE) und mit dem Elektronenmikroskop sichtbare kolloidale Partikel (KAYE; PAPPAS) in die Hornhaut aufgenommen werden.

2. Bedeutung der Zellstrukturen und des zytoplasmatischen Raumes als Träger der Enzyme.

Da ein Teil der Enzyme intramitochondrial gelegen ist, interessiert im Rahmen dieser Arbeit die Mitochondrienverteilung der einzelnen Schichten der Cornea. Es bestehen nämlich Entsprechungen hinsichtlich der zellulären Mitochondriengehalte und der Höhe der zellulären Spiegel mitochondrialer Enzyme. Hier sind zu nennen die Enzyme der Atmungskette, des Citratcyklus, wobei T-IDH¹⁾ und MDH intrazellulär mehrörtig, also auch im zytoplasmatischen Raum, zu finden sind (PETTE). Es lassen sich z.B. Unter-

1) Abkürzungen am Schluß der Arbeit

schiede mitochondrialer Enzymaktivitäten im weißen und roten Muskel durch unterschiedliche Mitochondriengehalte der beiden Muskeln erklären (PETTE). Wie in anderen mehrschichtigen Epithelien, so sind auch im Hornhautepithel Mitochondrien nur spärlich vorhanden (TENG). In den Stromazellen finden sich einige langgestreckte Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum (JAKUS; KAYE und PAPPAS).

Im Endothel jedoch finden sich mehr Mitochondrien, als man sie sonst in Epithelzellen beobachtet. Die peripheren Zellen besitzen sogar häufig ausgesprochen reiche Mitochondrienpopulationen (JAKUS). Bei geeigneter Methodik müßte man im Endothel also eine relativ hohe Aktivität intramitochondrialer Enzyme messen können.

Im Gegensatz zu den intramitochondrial fixierten Enzymen gibt es Enzyme, die nur im zytoplasmatischen Raum, dem unstrukturierten, "löslichen" Anteil der Zelle zu finden sind. Dies sind vor allem die Enzyme der Glykolyse, und es spricht alles dafür, daß der Embden-Meyerhoff-Abbau ebenfalls hier abläuft. Eine Zwischenstellung nehmen die bereits erwähnten T-IDH und MDH ein, die sowohl in den Mitochondrien fixiert als auch im Zytoplasma gelöst vorkommen können.

Die Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels sind von besonderer Bedeutung, weil sie über eine elementare Funktion der Zelle Auskunft geben: Die Produktion von chemischer Energie.

3. Enzymaktivitäten der Cornea aus der Literatur

Über die Aktivitäten einiger Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel gibt es mehrere Mitteilungen in der Literatur, über die Enzymaktivitäten im Stroma einzelne, über das Endothel keine. So wurden G-6-PDH und 6-PGDH, die die ersten Reaktionsschritte des

Hexose - Phosphat - Shunt katalysieren, von KINOSHITA und MASURAT im Hornhautepithel bestimmt. KUHLMAN und RESNIK ermittelten im Epithel und Stroma der Rattenhornhaut die Aktivitäten des Zwischenferments, der LDH, IDH, HK, ALD und der GLDH. KUHLMAN bestimmte später im Hornhautepithel von Kaninchen, Katzen und Ratten die Aktivitäten der LDH, ALD, HK, MDH, IDH, G-6-PDH und GSSGDH. Größere Meßreihen mit Aktivitätsbestimmungen von 15 Enzymen in getrennten Extrakten von Epithel und Stroma wurden von DELBRÜCK an der Rinderhornhaut ausgeführt. Er stellte fest, daß die Aktivität der IDH weit höher liegt, als die Aktivitäten der anderen Enzyme. REIM bestimmte 18 Enzymaktivitäten im Epithel und Stroma der Kaninchenhornhaut. Er fand im Epithel und Stroma ähnliche Werte der Enzymaktivitäten und stellte fest, daß die LDH im Epithel der Kaninchenhornhaut bei weitem die höchste Aktivität besitzt.

Die Werte der Enzymaktivitäten aus der Literatur sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Dort finden sich auch die Ergebnisse von R. MAIER, die parallel zu denen dieser Arbeit ermittelt worden sind.

4. Die Bedeutung des energieliefernden Stoffwechsels für die Hornhaut ("temperature reversal effect").

Der Energiestoffwechsel der Hornhaut hat nicht allein die Aufgabe, ihre Substanzen auf- und umzubauen, sondern ein wesentlicher Teil der gewonnenen Energie dient dazu, die Hornhaut klar und gleichmäßig dick zu halten. Somit hängen die optischen Eigenschaften der Hornhaut vom Energiestoffwechsel ab. Diese Abhängigkeit wurde in Versuchen von DAVSON, sowie HARRIS gezeigt. Ausgangspunkt war, daß alle enzymatischen Reaktionen, also auch die des energieliefernden Stoffwechsels, durch Abkühlen des Gewebes langsamer ablaufen. Wird ein Augapfel in wässrigem Medium, z.B. physiologischer NaCl-Lösung, bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, so

Tab. 1 Enzymaktivitäten im Hornhautepithel versch. Spezies in Int. Einh. (n Mol/g feucht/min) aus der Lit.

Spezies	LDH	GDH	HIM	ALD	TIM	GAPDH	PGK	PK	IDH	MDH	GOT	GPT	GLDH	G-6-PDH	6-PGDH	HK	GPM	AdK	GSSGDH
Kanin- chen 1	5125	1,0	29	5,4	955	575	177	70	15	87	2,1	1,1	1,6	14	3,3	2,7	89	18	-
Kanin- chen 2	8950			1,4					39	357			17			3,5			5,8
Rind 1	178	0,4	55	4,4		87	87	104	222	30	1,9		0,4	5,8	7,6	1,1			
Rind 3	228			1,7		50	100	44	1119	31	1,5	0,3	0,5	9,1	4,8	0,5			
Rind 4														0,8	0,8				
Katze 2	428			2,8					12	213				8,8		3,2			6,9
Ratte 2	364			1,4					18	260			0,6 ⁺	9,7		0,9			6,3
Kanin- chen 5	3543	1,7		3,9		409	127	35									50		
Schwein 5	491	0,4		4,8	349	103	153	69									95		
Mensch 5	287	1,2		6,8	435	175	77	222				1					3,6	90	

1 REIM, 2 KUHLMAN, ⁺KUHLMAN und RESNIK, 3 DELBRÜCK, 4 KINOSHITA, 5 MAIER
(diese Messungen wurden parallel zu dieser Arbeit durchgeführt.)

quillt die Hornhaut. Sie nimmt durch die starke Wasserbindungsfähigkeit der Mukopolysaccharide im Stroma, die den sog. Schwellungsdruck erzeugen, große Mengen Wasser sowie Na^+ , K^+ und Cl^- Ionen auf. Dadurch kann ihr Gewicht um das zehnfache steigen. Nach einer Theorie von MAURICE hängt die Klarheit der Hornhaut vom Abstand der Fibrillen und Stromalamellen ab, und dadurch läßt sich erklären, daß die gequollene Hornhaut trübe wird. Legt man die durch Abkühlung gequollene und getrübe Hornhaut in ein Medium mit normaler Temperatur zurück, so erlangt sie wieder ihre normale Dicke, und die Trübung schwindet, sofern Epithel und Endothel noch intakt sind. Dieser "temperature reversal effect" ist bis zu einem gewissen Grade auch nachweisbar, wenn nur noch das Endothel vorhanden ist, was Rückschlüsse auf die Bedeutung des Stoffwechsels des Endothels zuläßt. Diese Aussagen werden gestützt durch die Beobachtungen von STRAUB, SAUTTER und VELTEN, die besagen, daß schon geringe Läsionen des Endothels zu einer Quellung und Trübung des Stromas führen. Eine gleichartige Schwellung und Trübung der Hornhaut wird bei normaler Temperatur durch - dann allerdings irreversibel - die bekannten Stoffwechselgifte Jodazetat und 2,4 Dinitrophenol hervorgerufen. Diese Versuche wurden ergänzt bzw. erweitert durch die Beobachtungen von REIM und LICHTHE. Ihre Versuche zeigten, daß die isolierte Kaninchenhornhaut bei Lagerung in einer feuchten Kammer mit O_2 -haltiger Atmosphäre über 50 Stunden klar blieb. Erst nach dieser Zeit trat eine rasch zunehmende Trübung ein. Während einer Lagerungsperiode von mehr als 100 Stunden nahmen in der isolierten Hornhaut die Gehalte der Adenosinphosphatverbindungen, von Lactat und Pyruvat zuerst langsam, dann zunehmend stärker ab. Die Glukose war in der isolierten Hornhaut bereits nach einer Stunde nicht mehr nachweisbar. Solange die

Hornhaut klar war, blieben die ATP/ADP und Lactat/Pyruvat Quotienten genau so hoch wie in vivo. Mit dem steilen Anstieg der Trübungskurve der Hornhaut fielen gegenläufig die ATP/ADP und Lactat/Pyruvat Quotienten ab.

Wenn die isolierte Hornhaut in einer CO_2 -Atmosphäre gelagert wurde, trat die Trübung sofort nachdem O_2 -Entzug ein und zugleich wiederum ein gegenläufiger Abfall des ATP/ADP Quotienten. Der Lactatgehalt und der Lactat/Pyruvat Quotient stiegen in der anaerob gelagerten Hornhaut zu gleicher Zeit stark an. Die Beobachtung, daß unter verschiedenen Versuchsbedingungen zur gleichen Zeit mit der Eintrittung der Hornhaut der ATP/ADP Quotient abnahm, läßt eine Beziehung zwischen Energiestatus und Transparenz der Hornhaut vermuten.

Aus all diesen Versuchen wird die wichtige Schlußfolgerung gezogen, daß die Entwässerung der Hornhaut, bzw. die Erhaltung der normalen Hydratation, vom Energiestoffwechsel des Endothels und des Epithels abhängig ist. Der für die Funktion der Cornea so wichtige Transport von Wasser und Ionen durch die Grenzschichten der Hornhaut ist somit als ein aktiver Prozeß anzusehen. Diese "metabolische Pumpe" scheint vor allem im Endothel wirksam zu sein (HARRIS).

Die Diffusionsvorgänge im Hornhautepithel lassen sich nicht eindeutig darstellen, weil es aktiv Na^+ -Ionen in das Stroma transportiert (DONN et alias). Der Sinn dieser Na^+ Sekretion in das Stroma ist noch unklar, zumal sie sich ja gegen das Bestreben richtet, Wasser und Na^+ -Ionen aus dem Stroma fernzuhalten. Hier wird deutlich, wie schwierig es ist, den Mechanismus der Verschiebungen von Wasser und Ionen zwischen Hornhaut und umgebender Flüssigkeit aufzuklären. Sicher ist, daß der Energiestoffwechsel der zellreichen Grenzschichten - Epithel und Endothel - am Stofftransport beteiligt ist. Nach den Quellungsversuchen und den Erscheinungen beim "temperature reversal effect" zu urteilen, scheint besonders

das Endothel die für die Hornhautfunktion so wichtige Ausscheidung von Wasser und Ionen vorzunehmen. Nach neuen Ergebnissen von GREEN und KIKKAWA jedoch, die auf Messungen elektro-chemischer Parameter beruhen, scheint die Energie für den aktiven Transport von Na^+ und Cl^- -Ionen in das Kammerwasser hauptsächlich vom Epithel produziert zu werden.

II. Fragestellung und Plan der eigenen Untersuchungen

Aus den im vorangegangenen Abschnitt aufgezeigten Versuchen und Theorien hat sich die Fragestellung für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen ergeben. Die Aufgabe dieser Arbeit sollte sein, weitere Kenntnisse über den qualitativen und quantitativen Energiestoffwechsel der Hornhaut zu vermitteln, und zwar durch die Bestimmung einiger Enzymaktivitäten. Durch die Aufstellung von Enzymaktivitätsmustern sollten Auskünfte über einen funktionellen Zusammenhang der einzelnen Stoffwechselsysteme und über ihre quantitative Bedeutung für die verschiedenen Gewebe gegeben werden. Außerdem sollten durch genaue Bestimmungen der Substratoptima und Michaelis-Konstanten die enzymatisch optischen Testvorschriften gesichert bzw. modifiziert werden, die von BÜCHER, PETTE und LUH für andere Gewebe aufgestellt und von uns übernommen worden waren.

Wir führten Enzymbestimmungen von Schweine-, Kaninchen- und Menschenhornhäuten durch, und zwar sowohl vom Epithel als auch vom Endothel. Die Ergebnisse der Kaninchen-Epithelien gaben uns die Möglichkeit, unsere Werte mit den Mitteilungen aus der Literatur (s. Tab. 1) zu vergleichen und somit den Ergebnissen unserer Untersuchungen an Schweine- und Menschenepithelien sowie den Endothelwerten eine Vergleichsbasis zu geben. Für die Enzymaktivitäten des Endothels liegen noch keine vergleichbaren Mitteilungen aus der Literatur vor. Der vorangegangene Abschnitt zeigt deutlich, welche große Bedeutung dem Energiestoffwechsel des Endothels für die Funktion der Hornhaut beigemessen wird, und es galt besonders, durch Messungen von Enzymaktivitäten die Wege, auf denen die Reaktionen des Energiestoffwechsels im Endothel ablaufen, qualitativ und auch quantitativ näher kennenzulernen.

III. Methoden

1. Gewinnung der Extrakte

a. Gewinnung des im Experiment verwandten Gewebes

Die zu den Versuchen verwandten Schweineaugen wurden von Schlachttieren des Marburger Schlachthofes gewonnen. Die Augen wurden in unserer Gegenwart unmittelbar post mortem schonend enucleiert, auf Eis gelegt, und anschließend wurde mit der Präparation und Extraktgewinnung begonnen. Bei Augen, an welchen das Epithel untersucht wurde, achteten wir besonders darauf, daß das Epithel nicht mit dem Eis in unmittelbare Berührung kam.

Ferner dienten als Versuchstiere Kaninchen eines in Marburg gezüchteten Wildstammes. Die Tiere wurden in einem offenen Stall gehalten und mit Altromin-Kaninchenfutter ernährt. Sie hatten ein Körpergewicht von 3 bis 4 kg. Die Tötung der Tiere erfolgte mit 0,5 g Evipan i.v. in eine Vene der Ohrmuschel und anschließender Luftembolie. Dann wurde der Augapfel schonend enucleiert.

Die menschlichen Augen wurden von Patienten der Marburger Universitäts-Augenklinik gewonnen. Die Augen mußten aus verschiedenen Gründen enucleiert werden. Zum Teil wurden die Epithelien durch Abrasio mit einem Hockeymesser unmittelbar vor der Enucleation gewonnen.

b. Präparation des Epithels und Endothels

Zur Gewinnung des Epithels wurden die Augen zunächst vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %) abgespült. Dann wurde das Epithel unter leichtem Druck mit einem feinen Starmesser abradiert, wobei vom Limbus auf das Zentrum der Hornhaut hin gearbeitet wurde. Es wurde dabei sehr sorgfältig darauf geachtet, daß die Bowmannsche Membran nicht verletzt wurde. Das so gewonnene Gewebe wurde dann frisch in einem Glas-Potter Elvehjem-Homogenisator gewogen. Zur Gewinnung des Endothels wurden

Sclera und Coniunctiva circular unter Stehenlassen eines etwa 2 mm breiten Streifens um die Cornea durchschnitten. Dann wurden mit einer feinen Pinzette die Iris, der Cilliarkörper und die Linse von dem Scleraring abgezogen. Die Hornhaut wurde mit dem Epithel auf einen nach oben konvexen Kunststoffblock gelegt. Mit dem stumpfen Pol eines Hockeymessers wurde schließlich das Endothel sorgfältig unter Schonung der Descemetschen Membran abradiert und gewogen.

Tab. 2 Frischgewichte von feucht abradierten Epithelien und Endothelien in mg; diese Arbeit und Angaben aus der Literatur

	Diese Arbeit	REIM	FRENCH u. DUMA
Kaninchen			
Endothel	2,5	-	3,35
Epithel	7,31	5,45	5,65
Schwein			
Endothel	3,39	-	-
Epithel	14,9	13,5	-
Mensch			
Epithel	3,43	-	-

c. Gewichte von Epithel und Endothel der verschiedenen Spezies

Der erste Schritt der Analyse bestand in der Wägung des zu untersuchenden Gewebes. Denn die Enzymaktivitäten werden im allgemeinen nach Messung in wässrigen Extrakten

durch Rechnung auf das Gewicht des frischen Gewebes bezogen. In Tab. 2 sind die Durchschnittsgewichte von Epithelien und Endothelien der Spezies Schwein, Kaninchen und Mensch dieser Arbeit den Werten aus der Literatur gegenübergestellt. Es ergab sich, daß keine wesentlichen Unterschiede zu den Gewichtsangaben der Literatur bestanden.

d. Extraktion der Enzyme aus dem Gewebe

Das gewonnene Gewebe, sowohl das Epithel als auch das Endothel, wurde nach dem Wiegen sofort mit eiskaltem 100 mM Na-K-Phosphatpuffer vom pH 7,3 versetzt und unter ständiger Kühlung 4 x 15 sec homogenisiert, und zwar in dem Glas-in-Glas-Potter-Elvehjen-Homogenisator. Das Homogenat wurde in der Ultrazentrifuge "Omikron" der Fa. M. Christ bei 20 000 U/min (= 45 000 x g) 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand stellte den Extrakt dar, der für die Enzymbestimmungen verwandt wurde. In einigen Versuchen wurden die Extraktionsmethoden und Extraktionsmedien modifiziert, um zu prüfen, ob die Extraktion mit der angewandten Methode vollständig war.

2. Testmethoden

a. Geräte und Reagentien

Die Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgten nach den Testvorschriften von BÜCHER, LUH und PETTE. In einzelnen Fällen wurden geringe Änderungen vorgenommen in Anpassung an die geringen Gewebsmengen von Hornhautepithel und Endothel. Die Extinktionsmessungen wurden an dem VITATRON Photometer mit Registriereinrichtung (Vitatron Scientific Instruments Dieren-Holland) ausgeführt und an dem Photometer EPPENDORF (Fa. Netheler u. Hinz, Hamburg-Wellingsbüttel) mit Skalenspreizung und Registriereinrichtung. Die Messungen erfolgten im allgemeinen in Normal-

cuvetten mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm. Bei Enzymen mit geringer Aktivität wurde mit Halbmikrocuvetten bei einer Schichtdicke von $d = 2$ cm und mit 2 bis 4facher Skalenspreizung gearbeitet. Getestet wurden bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $\text{pH} = 7,6$, bei einer Reaktionstemperatur von 25°C und bei einer Wellenlänge von 334 m μ im VITATRON Photometer und 366 m μ im EPPENDORF Photometer.

Die biochemischen Reagentien wurden bis auf wenige Ausnahmen durch die Fa. C.F. BOEHRINGER und Söhne GMBH, Mannheim-Waldhof, bezogen. Anstelle von quarzdestilliertem Wasser wurde ionenfreies Wasser mit einem Leitwiderstand von mehr als 2 Meg OHM verwendet, das mittels einer kleinen Wasseraufbereitungsanlage der Fa. A. LANG, Zürich 47, gewonnen wurde.

Pipettiert wurde hauptsächlich mit den EPPENDORF-PIPETTEN der Fa. Netheler und Hinz (Mikrosystem "Marburg").

Die Testung eines Extraktes erfolgte bis auf einige Ausnahmen an demselben Tag, an dem das Gewebe extrahiert worden war. Alle Enzymaktivitäten in den einzelnen Extrakten wurden mindestens doppelt mit verschiedenen großen Einsätzen bestimmt. Die Werte zeigten bis auf einzelne Ausnahmen weitgehende Proportionalität.

b. Testvorschriften

Bei den Testvorschriften (S. 15 ff.) werden auf der linken Seite die millimolaren Konzentrationen der Reagentien angegeben, rechts die Testzusammensetzung aus den einzelnen Reagentien. Unter dem Strich stehen die Substanzen oder Enzyme, durch deren Zusatz in der Meßcuvette die jeweiligen Testreaktionen ausgelöst werden.

Malat-Dehydrogenase - M D H

TRAP	50	mM	0,5	ml	TRAP	100	mM	mit	10	mM	EDTA
EDTA	5	mM						pH	7,6		
DPNH	0,22	mM	0,02	ml	DPNH	11	mM	c =	8		
Extrakt			0,01-0,03	ml	Hornhautepithel	1	:	10	verdünnt		
Wasser			ad	0,99	ml						

OAA 1,5 mM 0,01 ml OAA 30 mM, c = 4

OAA jedesmal frisch ansetzen und vor dem Test die Konzentration bestimmen !

Schreibskala 0 - 1,0 d = 1

Substratopt. OAA für Epithel und Endothel 1,3 - 3,0 mM¹⁾

Isocitrat-Dehydrogenase T-I D H

TRAP	50	mM	0,5	ml	TRAP	100	mM	mit	10	mM	EDTA
EDTA	5	mM						pH	7,6		
TPN	0,3	mM	0,02	ml	TPN	15	mM	c =	12,5		
Mg ⁺⁺	8	mM	0,05	ml	MgCl ₂	160	mM				
Extrakt			0,03-0,05	ml	Hornhautepithel Kaninchen						
					Schwein unverdünnt						
Wasser			ad	0,98	ml						

IC 1,3 mM 0,02 ml D-Isocitrat 65 mM, c = 16,9
(Fluka AG, Buchs)

Schreibskala 0 - 0,500 ; d = 2

Bei der D-IDH wurde statt TPN DPN verwandt.

Substratopt. für D-IC: Epithel 0,85 - 2,1 mM
Endothel 0,7 - 1,75 mM

- 1) Die unter den Testvorschriften angegebenen Substrat-optima wurden von uns für die Enzymtests von Hornhaut-epithel und Endothel ermittelt (siehe S. 21 ff.)

Glutamat-Dehydrogenase - G L D H

TRAP	50	mM	0,5 ml	TRAP 100 mM mit 10 mM
EDTA	5	mM		EDTA pH 7,6
DPNH	0,22	mM	0,02 ml	DPNH 11 mM, c = 8
(NH ₄) ₂ SO ₄	40	mM	0,05 ml	(NH ₄) ₂ SO ₄ 800 mM
Extrakt			0,03-0,05 ml	Hornhautepithel
Wasser			ad 0,98 ml	

α KG 3 mM 0,02 ml α KG 150 mM, c = 22

Schreibskala 0 - 0,250, d = 2

Extinktionsänderung vor Zusatz von α KG ist auf mitochondriale DPNH-Oxydase zurückzuführen.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase G-6-PDH

TRAP	50	mM	0,5 ml	TRAP 100 mM mit 10 mM
EDTA	5	mM		EDTA pH 7,6
TPN	0,3	mM	0,02 ml	TPN 15 mM, c = 12,5
Extrakt			0,02 ml	Hornhautepithel
Wasser			ad 0,98 ml	
G-6-P	2,0	mM	0,02 ml	G-6-P 100 mM, c = 30,4

Schreibskala 0 - 0,500 oder 0 - 0,250; d = 2

Substratoptimum G-6-P: Epithel 0,46 - 4,6 mM

Endothel 1,0 - 5,5 mM

6-Phosphogluconat-Dehydrogenase 6-PGDH

TRAP	50	mM	0,5	ml	TRAP	100	mM mit	10	mM
EDTA	5	mM					EDTA pH	7,6	
TPN	0,3	mM	0,02	ml	TPN	15	mM, c =	12,5	
Mg ⁺⁺	8	mM	0,05	ml	MgCl ₂	160	mM		
Extrakt			0,04	ml	Hornhautepithel				
Wasser			ad	0,98	ml				

6-PGS 1 mM 0,02 ml 6-PG-C 50 mM, c = 28,7

Schreibskala 0 - 0,500 oder 0 - 0,250; d = 2

Substratoptimum 6-PGS: Epithel 1,0 - 10,1 mM

Endothel 1,0 - 2,7 mM

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase G O T

KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	100	mM	0,5	ml	K-Phosphatpuffer	200	mM
EDTA	10	mM			mit 20 mM EDTA, pH 7,4		
DPNH		0,22	mM	0,02	ml	DPNH	11 mM, c = 8
α KG	5	mM	0,05	ml	α KG	100	mM, c = 15
MDH	40	BE/ml	0,02	ml	MDH	c = 2,5; 1 : 4	
Extrakt			0,03-0,05	ml	Hornhautepithel		
Wasser			ad	0,95	ml		
L-Aspartat	30	mM	0,05	ml	L-Asparaginsäure	600	mM
					c = 80 in 1 ml 1n NaOH		
					gelöst, tgl. frisch		

Schreibskala 0 - 0,500 ; d = 2

Vorlauf durch mitochondriale DPNH-Oxydasen sowie durch GLDH-GOT-Gehalt der MDH muß abgezogen werden, d.h. Kontrolltest ohne Extrakt-

Substratoptimum αKG: Epithel 2,0 - 5,0 mM

Endothel 1,0 - 10 mM

L-Aspartat: Epithel 5,0 - 30 mM

Endothel 10 - 40 mM

Glutamat-Pyruvat-Transaminase G P T

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$	100 mM	0,5 ml	K-Phosphatpuffer	200 mM
EDTA	5 mM		mit 10 mM EDTA; pH 7,4	
DPNH	0,22 mM	0,02 ml	DPNH	11 mM, c = 8
α KG	7 mM	0,05 ml	α KG	150 mM, c = 22
LDH	40 BE/ml	0,005 ml	LDH	c = 5, 1 : 10
Extrakt		0,05 ml	Hornhautepithel	
Wasser	ad	0,96 ml		

L-Alanin 40 mM 0,04 ml d,L-Alanin 2 molar
 = 178 mg in 1 ml 1n
 NaOH lösen; tgl. frisch

Schreibskala 0 - 0,250; d = 2

Vorlauf durch DPNH-Oxydasen, sowie durch GLDH

GPT-Gehalt der LDH muß berücksichtigt werden.

Hexokinase H K

TRAP	50 mM	0,5	ml	TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5 mM			pH 7,6
TPN	0,3 mM	0,02	ml	TPN 15 mM, c = 12,5
Mg ⁺⁺	8 mM	0,05	ml	MgCl ₂ 160 mM
ATP	1,5 mM	0,02	ml	ATP 75 mM, c = 45,5
D-Glucose	2 mM	0,02	ml	D-Glucose 100 mM
G-6-PDH	40 BE/ml	0,01	ml	G-6-PDH c = 5, 1 : 10
Wasser	ad	0,95	ml	

Extrakt 0,05 ml Hornhautepithel

Schreibskala 0 - 0,500 ; d = 2

Adenylatkinase (Myokinase) A d K

TRAP	50	mM	0,5	ml	TRAP	100	mM mit 10 mM
EDTA	5	mM			EDTA		pH 7,6
DPNH	0,22	mM	0,05	ml	DPNH	11	mM, c = 8
Mg ⁺⁺	8	mM	0,05	ml	MgCl ₂	160	mM
KCl	75	mM	0,05	ml	KCl	1500	mM
ATP	3	mM	0,04	ml	ATP	75	mM, c = 45,5
PEP	0,8	mM	0,01	ml	PEP-C	100	mM, c = 46,6
PK	60	BE/ml	0,005	ml	PK	c = 2,	unverdünnt
LDH	120	BE/ml	0,012	ml	LDH	1 : 10,	c = 5
Extrakt			0,03	ml	Hornhautepithel		
Wasser			ad	0,98	ml		
AMP	3	mM	0,02	ml	AMP	150	mM, c = 55

Schreibskala 0 - 0,500; d = 2

Substratoptimum ATP: Epithel 3,95 - 7,9 mM
 Endothel 3,5 - 12 mM
 AMP: Epithel 1,5 - 5,0 mM
 Endothel 1,0 - 7,5 mM

Succinat - Dehydrogenase S u c c D H 1)

o,5 ml	K-Phosphat-Puffer pH 7,4
o,05 ml	Cytochrom-C 2 % c = 20
o,01 ml	KCN o,1 m c = 6,5
o,01 ml	Extrakt
ad o,98 ml	Wasser

o,02 ml Na - Succ. 1 m c = 270

Messung bei 546 mn

Glycerin - Phosphat - Oxydase G P O x 1)

o,5 ml	K-Phosphat-Puffer pH 7,4
o,05 ml	Cytochrom-C 2 % c = 20
o,01 ml	KCN o,1 m c = 6,5
o,01 ml	MgCl ₂ 1 m
o,01 ml	Extrakt

o,02 ml G - 1 - P 1 m c = 324

Messung bei 546 mn

Die Extraktmenge vom Hornhautendothel wurde bei allen Tests entsprechend den Mengenangaben für das Epithel der Meßcuvette zugesetzt.

1) Nach KADENBACH

c. Auswertung der Messungen

Die Enzymaktivitäten wurden auf das Feuchtgewicht des frischen Gewebes bezogen. Die Berechnung der Enzymaktivitäten in den Gewebsextrakten erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Enzymaktivität (IE / g frisch)} \\ = \frac{E \times 10^6}{\text{Minuten} \times \epsilon \times d \times \text{Einsatzvolumen} \times \text{Gewebsgewicht}} \times \text{Testvolumen} \times \text{Extraktvolumen}$$

wobei ist: IE : Internationale Einheit (=Umsatz an Substrat in u Mol/min)

E : Extinktionsdifferenz

10^6 : Konstante für Dimension u Mol

ϵ : Extinktionskoeffizient

für 334 mu = $6,09 \times 10^6$

für 366 mu = $3,3 \times 10^6$

d : Schichtdicke der Cuvette

Die Berechnung der statistischen Parameter wurde nach den Formeln und Angaben der "WISSENSCHAFTLICHEN TABELLEN GEIGY", 6. Auflage 1960, vorgenommen.

3. Bestimmung der Substratoptima und Michaeliskonstanten, kinetische Untersuchungen

Da die Testvorschriften zur Bestimmung von Enzymen von BÜCHER, PETTE und LUH übernommen wurden, bestand eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit darin zu bestimmen, ob die von diesen Autoren vorgeschlagenen Substratoptima auch für die Enzyme der hier untersuchten Gewebe Gültigkeit hatten. Es galt auszuschließen, daß die Konzentrationen der zugesetzten Substrate weder zu niedrig, noch zu hoch, und somit unter Umständen im Bereich der Substrathemmung lagen. Aus diesem Grunde wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt. Gewebsmaterial war Schweinehornhautepithel und Endothel. Die Substratoptima

der Enzyme wurden bestimmt, indem die Größe des Extraktvolumens konstant gehalten und der Einsatz des Substrates variiert wurde. Die ermittelten Werte wurden in ein Koordinatensystem eingetragen, wobei auf der Abszisse der Einsatz des Substrates (mM) im Testvolumen, auf der Ordinate die Enzymaktivität im Test in internationalen Einheiten ($\text{IE/g}_{\text{frisch}}$) aufgetragen wurden. Die ermittelten Kurven stiegen in typischer Weise zunächst steil an, um dann etwa parallel zur Abszisse zu verlaufen. Vom ersten Teil des waagrechten Verlaufes läßt sich rein empirisch durch Fällen eines Lotes auf die Abszisse der Bereich der optimalen Substratkonzentration im Enzymtest schätzen. Dies ist anhand der 6-PGDH in Abb. 1 graphisch dargestellt. Die einzelnen Substratoptima sind jeweils unter den Testvorschriften angegeben. Beim Vergleich dieser experimentell ermittelten Werte mit den in den Testvorschriften angegebenen stellte sich eine weitgehende Übereinstimmung heraus. Lediglich bei dem Substrat der MDH, dem Oxalacetat, mußte die Konzentration im Testvolumen sowohl bei Messungen des Epithels als auch des Endothels von 0,25 mM auf 1,3 mM erhöht werden.

Zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten wurde anschließend in ein Koordinatensystem auf der Abszisse $\frac{1}{S}(-\frac{1}{\text{mM}})$ und auf der Ordinate $\frac{1}{V}(-\frac{1}{\text{IE}})$ aufgetragen (nach LINEWEAVER und BURCK). Dies ist ebenfalls wieder anhand der 6-PGDH in Abb. 2 graphisch dargestellt. Die Verbindung der aufgetragenen Punkte ergab eine Gerade. Im Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ließ sich an den Koordinaten die Michaelis-Konstante ablesen.

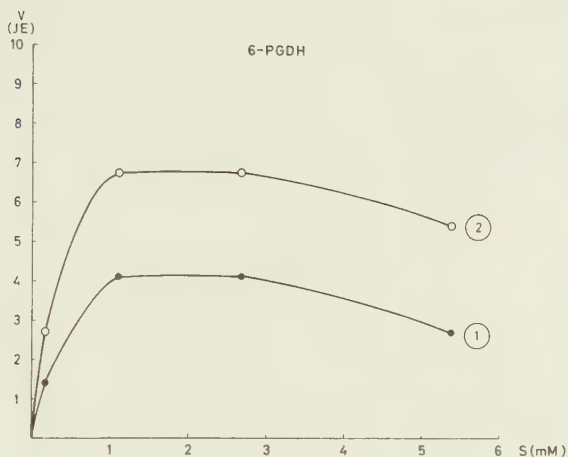


Abb. 1 Graphische Darstellung der Bestimmung des Substratoptimums von 6-PGC der 6-PGDH im Schweinehornhautendothel.

Auf der Ordinate ist die Enzymaktivität in internationalen Einheiten/ $g_{\text{frisch}}(V)$, auf der Abszisse die Konzentration des Substrates in mM = millimolar (S) im Test.

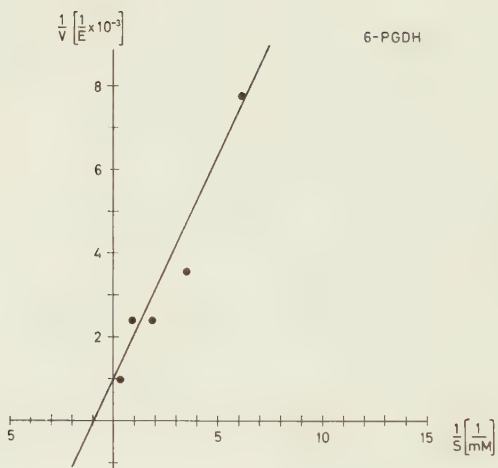


Abb. 2 Graphische Darstellung von $\frac{1}{S}$ und $\frac{1}{V}$ zur Berechnung der Michaelis-Konstanten nach LINEWEAVER und BURCK.

4. Bestimmung des Proteingehaltes der Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden regelmäßig Proteinbestimmungen durchgeführt. Es wurden die Biuret-Methode nach BEISENHERZ, BOLTZE, BÜCHER, CZOK, GARBADE, MEYER-ARENDT und PFLEIDERER angewandt, die auf die hier vorliegenden Mikroverhältnisse umgestellt wurde. Bei der einfachen Biuret-Methode wurde die Extraktmenge mit 1,0 ml Biuret-Reagens versetzt und mit physiologischer NaCl-Lösung auf 2,0 ml aufgefüllt. Nach 30 minütigem Rühren mit einem Magnetrührer wurde im Photometer "EPPENDORF" bei 546 mμ in einer Cuvette mit der Schichtdicke $d = 2$ cm die Extinktion gemessen.

Auch die Modifizierung dieser Methode wurde angewandt, indem der Gewebsextrakt mit TCA versetzt und das ausgefällte Eiweiß abzentrifugiert wurde. Das Sediment wurde nach Zusatz von Biuret-Reagens und physiologischer NaCl-Lösung nach ebenfalls 30 minütigem Rühren gemessen wie oben. Aus den Messungen ergab sich, daß die Werte beider Verfahren praktisch keine Abweichungen zeigten. In Tab. 3 sind die Ergebnisse dieser Arbeit Vergleichswerten aus der Literatur gegenübergestellt.

Es zeigt sich, daß die Ergebnisse dieser Arbeit, gewonnen von Schweinehornhautepithelien und Endothelien, erheblich unter den Werten von FRENCH und DUMA liegen, die von Kaninchenhornhäuten gewonnen wurden. Die Stickstoffbestimmungen dieser Autoren wurden mit einer Mikro-Kjeldahl-Methode und ihre Eiweißbestimmungen nach Folin-Ciocalteu unter Verwendung eines Standards aus Gelatine gewonnen. Da FRENCH und DUMA TCA-Extrakte der Gesamthomogenate untersuchten, liegen ihre Werte um ein Vielfaches höher als die Werte dieser Arbeit. KAWERAU und OTT bestimmten den Eiweißgehalt in wässrigen Extrakten vom Epithel der Rindercornea. Wie Tab. 3 zeigt, liegen ihre Ergebnisse nicht weit von denen

dieser Arbeit entfernt. Setzt man die Angaben der Literatur in Beziehung zu den hier vorgelegten Befunden, so kann man annehmen, daß die absoluten Werte für den Proteingehalt in den Epithel- und Endothelextrakten trotz der geringen Gewebs- und somit Proteinmengen hinreichend genau sind. Übereinstimmend scheint auch bei den Werten dieser Arbeit und der Literatur, daß der Eiweißgehalt des Endothels wesentlich niedriger liegt als der des Epithels.

Tab. 3 Proteingehalt von Hornhautepithel und Endothel in mg/g Frischgewicht einiger Spezies; diese Arbeit und Angaben aus der Literatur;
 $\bar{M} \pm S_M$; n = Zahl der Untersuchungen

Spezies	Epithel	Endothel	Methode
Schwein	76,3 $\pm$ 6,7 n = 9	23,1 $\pm$ 4,2 n = 8	Biuret ¹⁾
Kaninchen	115 $\pm$ 9,2		Biuret ²⁾
Kaninchen	281	154	Mikro-Kjeldahl ³⁾
Rind	95,8	-	Biuret ⁴⁾

1) Diese Arbeit

2) REIM und SCHRAMM

3) FRENCH und DUMA ; gesamtes Protein nach TCA-Fällung des Homogenates

4) KAWERAU und OTT; in Wasser extrahierbares Protein

IV. Ergebnisse

1. Enzymaktivitäten im Hornhautepithel bei verschiedenen Spezies

a. Kaninchen

Getestet wurden zwei Enzyme des Citronensäurecyklus, nämlich IDH und MDH, außerdem die Transaminase GOT, die zum Hexose-Phosphat-Shunt gehörigen 6-PGDH und G-6-PDH, sowie die AdK. In Tab. 5 sind die Ergebnisse der Enzymbestimmungen eingetragen. In Tab. 7 sind sie mit den Ergebnissen der anderen Spezies Mensch und Schwein verglichen. Die Relationen der einzelnen Enzymaktivitäten zueinander sind in Abb. 3 in Form eines Enzymverteilungsmusters graphisch dargestellt. In Abb. 7 und Tab. 1 sind außerdem die Werte von Enzymen der Glykolysekette mit aufgeführt, die von R. MAIER parallel zu diesen Untersuchungen bestimmt worden sind. Die in der Literatur von REIM und KUHLMAN (s. Tab. 1) mitgeteilten Enzymaktivitäten des Epithels der Kaninchenhornhaut stimmen weitgehend mit den vorliegenden Ergebnissen überein.

So ließen sich auch hier die Enzyme des Citronensäurecyklus in relativ hohen Aktivitäten im Hornhautepithel der Kaninchen nachweisen. Auffällig war die sehr niedrige Aktivität der Transaminase GOT. Die Kapazitäten der G-6-PDH und der 6-PGDH sind im Epithel nach den vorliegenden Befunden hoch genug, um die von KINOSHITA und MASURAT, sowie von v. HOLT und Mitarbeitern beobachtete Oxydation eines Teiles der Glukose über den Hexose-Phosphat-Shunt zu katalysieren. Die die Reaktion $2 \text{ ADP} \longrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ katalysierende AdK zeigte eine recht hohe Aktivität.

Noch höher lagen die Aktivitäten der Enzyme der Glykolysekette, bestimmt von R. MAIER, die bei den Vergleichswerten aus der Literatur aufgeführt sind. Das Enzym mit der höchsten Aktivität war die LDH. Es folgten die Enzyme der Gruppe, die den Umsatz der Triosephosphate in der Glykolyse katalysieren (TIM, GAPDH, PGK, GMP, PK). Die niedrigste Aktivität hatte von den dort aufgeführten Enzymen die ALD, so daß bei maximalen Flussraten über die Glykolysekette eine Ventilwirkung möglich erscheint. (REIM und SCHRAMM).

b. Schwein

Über Messungen von Enzymaktivitäten von Schweinehornhäuten gibt es noch keine Mitteilungen in der Literatur. Getestet wurden hier dieselben Enzyme, wie auch bei den Epithelien der Kaninchenhornhäute. Speziesunterschiede in der Höhe der Aktivitäten, die etwa mit dem IDH-Wert in dem Rinderhornhautepithel (DELBRÜCK) zu vergleichen gewesen wären, wurden nicht gefunden. Vielmehr kann man sagen, daß die Werte bei Schweine- und Kaninchenhornhautepithel in etwa alle in der gleichen Größenordnung lagen und somit die Umsatzraten des Stoffwechsels durchaus zu vergleichen sind. Die Ergebnisse der Enzymbestimmungen sind in Tab. 4 eingetragen, der Vergleich zu den anderen Spezies findet sich in Tab. 7. Die Relationen der einzelnen Enzymaktivitäten zeigt Abb. 3 in Form eines Enzymverteilungsmusters. Im Vergleich zum Kaninchenhornhautepithel zeigen die Enzyme MDH und AdK im Epithel der Schweinehornhaut eine doppelt so hohe Aktivität, während im Corneaepithel von Schweinen die GOT noch etwas höher liegt. Fast um ein Drittel niedriger ist im Schweinehornhautepithel die Aktivität der IDH, es entsprechen sich in etwa die Werte der 6-PGDH und G-6-PDH. Beim Vergleich mit den Werten von R. MAIER in Tab. 1 und Abb. 8 zeigt sich, daß auch im Hornhautepithel von

Schweinen die Enzyme der Glykolysekette höhere Werte erreichen, als bei Kaninchen.

c. Mensch

M. REIM bestimmte die Enzymaktivitäten im menschlichen Hornhautepithel in Extrakten von Hornhautepithelien von drei Patienten mit Hornhautepithel-Dystrophie. Das Epithel wurde bei diesen Patienten aus therapeutischen Gründen in Lokalanästhesie abradiert. Im Rahmen dieser Arbeit und der von R. MAIER wurden die Messungen fortgeführt, und zwar standen uns mit diesen genannten drei Werten im Endeffekt die Epithelien von elf Patienten mit den verschiedensten klinischen Befunden zur Verfügung: Hornhautepitheldystrophie, Epithelödem bei absolutem Glaukom, rezidivierende Erosio in Abhängigkeit vom monatlichen Zyklus, chronisch proliferierende Entzündung von Netz- und Aderhaut, Ciliarkörpermelanom und Glaukom mit rezidivierenden Vorderkammerblutungen. Einige dieser Augäpfel mußten aus therapeutischen Gründen enucleiert werden. Da sich diese verschiedenen klinischen Befunde nicht in irgendeiner auffallenden Weise im Enzymmuster ausdrückten, sondern die Unterschiede der Aktivitäten im Bereich der normalen Streuung liegen, schien es gerechtfertigt, die gemessenen Werte zusammenzufassen und statistisch auszuwerten. Die Ergebnisse sind aus der Tab. 6 und der Abb. 3 mit dem entsprechenden Enzymmuster zu ersehen. Der Vergleich zu den anderen Spezies Kaninchen und Schwein findet sich in Tab. 7. In Tab. 1 und Abb. 4 sind ebenfalls - um das vollständige Muster zu zeigen - die Werte aus der Arbeit von R. MAIER zu ersehen. Gemessen wurden dieselben Enzyme wie bei den Epithelien der beiden vorangegangenen Spezies. Da die Hornhautepithelien bei den meisten Patienten, außer einem Fall mit Epithelödem, klinisch normal waren, und sich die gemessenen

Werte der einzelnen Epithelien nicht auffällig voneinander unterschieden, darf wohl angenommen werden, daß die in Tab. 6 niedergelegten Ergebnisse weitgehend ein normales Enzymbild des menschlichen Hornhautepithels wiedergeben.

Auffällige Abweichungen der Ergebnisse von den Befunden der Tierversuche waren nicht zu erkennen. Das gleiche läßt sich auch von den von REIM gemessenen Metabolitgehalten sagen. Die Ergebnisse der Enzymbestimmungen und der Metabolitgehalte stimmen somit weitgehend mit denen der von uns gemessenen tierischen Hornhautepithelien überein. Es zeigte sich damit, daß die Reaktionen des Energiestoffwechsels im Hornhautepithel bei diesen Spezies sehr ähnlich verlaufen müssen, und daß Analogieschlüsse wohl erlaubt sind (REIM). Zu erwähnen ist hier noch die Tatsache, daß der histologische Aufbau des Hornhautepithels gerade bei den Spezies Mensch und Schwein sehr ähnlich ist (CALMETTES und Mitarbeiter).

Tab. 4 Enzymaktivitäten im Hornhautepithel in
 IE/ ϵ_{frisch} vom Schwein; Mittelwert und
 Standardabweichungen des Mittelwertes ($M \pm S_M$);
 n = Anzahl der Untersuchungen

Enzyme	M	n	S_M
LDH	5,0	15	$\pm 0,54$
MDH	164,0	14	$\pm 31,8$
GOT	2,86	18	$\pm 0,24$
6-PGDH	3,5	7	$\pm 0,34$
G-6-PDH	5,8	13	$\pm 0,7$
AdK	19,1	15	$\pm 1,37$

Tab. 5 Enzymaktivitäten im Hornhautepithel in
 IE/g_{frisch} vom Kaninchen; $M \pm S_M$
 n = Anzahl der Untersuchungen

Enzyme	M	n	S_M
IDH	13,8	5	$\pm 2,97$
MDH	76,6	3	$\pm 6,6$
GOT	0,86	6	$\pm 0,19$
6-PGDH	3,3	6	$\pm 0,32$
G-6-PDH	7,72	6	$\pm 0,29$
AdK	7,8	5	$\pm 1,07$

Tab. 6 Enzymaktivitäten im Hornhautepithel in
 IE/g_{frisch} vom Menschen; $M \pm S_M$
 n = Anzahl der Untersuchungen

Enzyme	M	n	S_M
IDH	3,2	10	$\pm 0,77$
MDH	191,0	10	$\pm 43,4$
GOT	2,2	8	$\pm 0,47$
6-PGDH	8,5	8	$\pm 1,74$
G-6-PDH	2,77	8	$\pm 0,78$
AdK	5,7	8	$\pm 0,8$

Tab. 7 Vergleich der Enzymaktivitäten im Hornhaut-
epithel in IE/g_{frisch} vom Schwein, Kaninchen
und Menschen

Enzyme	Schwein	Kaninchen	Mensch
IDH	5,0	13,8	3,2
MDH	164,0	76,6	191,0
GOT	2,86	0,86	2,2
6-PGDH	3,5	3,3	8,5
G-6-PDH	5,8	7,72	2,77
AdK	19,1	7,8	5,7

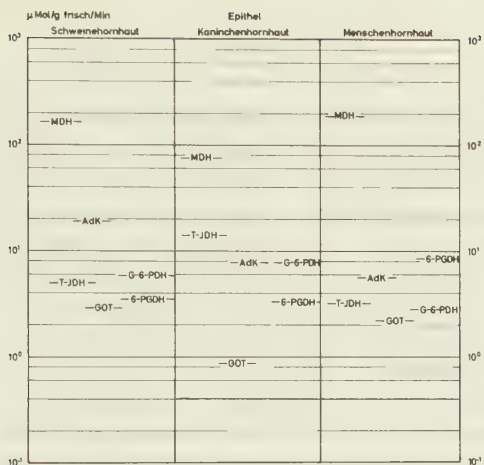


Abb. 3 Enzymverteilungsmuster der Enzymaktivitäten im Hornhautepithel von Schwein, Kaninchen und Mensch

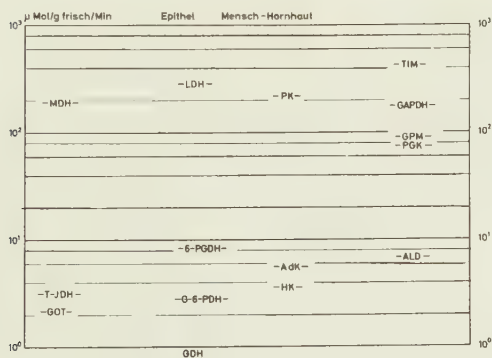


Abb. 4 Enzymverteilungsmuster der Enzymaktivitäten im Hornhautepithel des Menschen. Mitaufgeführt sind die Werte von R. MAIER (1967)

d. Tropfen von Kaninchenhornhäuten mit Prednisolon-trimethylacetat

Ähnliche Versuche wurden früher von REIM und SCHRAMM vorgenommen. Bei diesen Experimenten wurden im Epithel und Stroma von Kaninchenhornhäuten 18 Enzyme der Glykolyse und des Citronensäurecyklus bestimmt und eine relative Zunahme der Enzymaktivitäten bei experimenteller Keratitis herpetika festgestellt. Eine Verminderung der Aktivitäten dieser Enzyme trat nach lokaler Behandlung der Tiere mit dem Virostatikum 5 - Joduracil - 2 - desoxyribosid (IUDR) ein. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die in der Klinik beobachteten Nebenwirkungen bei der Therapie des Herpes corneae mit IUDR-Tropfen durch eine Hemmung der Proteinsynthese und eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels infolge herabgesetzter Enzymaktivitäten hervorgerufen werden könnte (REIM).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche gemacht mit der Fragestellung, ob eine Induktion von Enzymaktivitäten durch Cortisolgaben auch im Hornhautepithel hervorgerufen ist, wie das in zahlreichen Mitteilungen aus der Literatur über die Leber angegeben wird. So stellen beispielsweise W. EWALD, H.J. HÜBENER und E. WIEDEMANN nach enteraler Cortisol-Applikation gleichzeitig mit eintretender Glukoneogenese einen Anstieg von Tyrosin-2 - Oxoglutarat - Transaminase und Tryptophan - Pyrrolase fest. Nach portaler Infusion von Cortisol fanden O. ESTRADA SERGIO und F. CORDOBALA ein klares Ansteigen der Glutamat - Aspartat - Transaminase in der Leber. Bei Untersuchungen von GELLER, YUWILER, SHAPIRO stiegen nach Cortisol-Injektion die Aktivitäten der Leber-Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase, Tryptophan- α -Ketoglutarat-Transaminase und Tryptophan-Pyrrolase an. Nachdem HOHORST, KREUTZ, REIM und HÜBENER Änderungen der

Metabolitgehalte des energieliefernden Stoffwechsels und des Redoxstatus in der Rattenleber nach Applikation von Corticosteroiden gefunden hatten, sollte hier an der Cornea geprüft werden, ob auch die entsprechenden Enzyme Änderungen erfahren. Dies erschien uns von Wichtigkeit, da die Corticosteroide in der Therapie der Augenheilkunde einen großen Raum einnehmen.

Es wurden jeweils 2 Kaninchen 8 bzw. 16 Tage lang halbstündlich mit 0,3 %igen Ultracortenol-Augentropfen (Prednisolon-trimethylacetat) über 10 Stunden am Tag in den Coniunctivalsack getropft. Abends gaben wir Ultracortenol-Augensalbe 0,5 %ig in den Coniunctivalsack. Gemessen wurden dieselben Enzyme wie bei den anderen bisher aufgeführten Untersuchungen. Es konnte bei keinem der gemessenen Enzyme, auch nicht bei denen der Glykolyse, eine auffällige Veränderung festgestellt werden, die Streuungen bewegten sich im Rahmen der Norm.

Leider stellt die Menge an appliziertem Cortisol in diesem Versuch eine unbekannte Größe dar, schon wegen der nicht bekannten Diffusionsrate des Cortisols durch das Epithel. In den oben aufgeführten Literaturangaben wurde eine Cortisolgabe von 50 mg/kg angegeben. Immerhin kann man nach Mitteilungen von LEOPOLD und Mitarbeitern annehmen, daß die Substanz wenigstens im Epithel Wirkung entfaltet und sogar bis ins Kammerwasser gelangt.

Genauere Angaben finden sich bei neuen Untersuchungen von DRAEGER mit ^{14}C markiertem Hydrocortison, Dexamethason und einem fluorhaltigen Steroid. Er stellte fest, daß je 1 % der applizierten Dosis in der Cornea, der Vorderkammer und der Iris erscheinen, 100 mal weniger in der Linse und allen tieferen Augengeweben.

2. Enzymaktivitäten im Hornhautendothel bei verschiedenen Spezies

In dem Einleitungskapitel dieser Arbeit wurde schon auf die wahrscheinlich große Bedeutung des Energiestoffwechsels des Hornhautendothels für die Transparenz der Hornhaut hingewiesen. Die Lücke, die zwischen der Kenntnis und der Bedeutung des Energiestoffwechsels des Hornhautendothels besteht, sollte in dieser Arbeit und in der Arbeit von R. MAIER zu schließen begonnen werden.

Der Einfluß des Endothels konnte bisher durch entsprechende Analysen noch nicht exakt erfaßt werden. Nach dem elektronenmikroskopischen Aufbau des Endothels und Untersuchungen verschiedener oben genannter Autoren über die Funktion der zellreichen Grenzschichten der Hornhaut wird angenommen, daß der für die Klarheit der Hornhaut so wichtige aktive Transport von Wasser und Ionen aus dem Stroma in die angrenzenden Flüssigkeitsräume zum Teil vom Endothel ausgeführt wird. Hierfür sprechen auch neue elektronenmikroskopische Befunde von IWAMOTO und SMELSER, sowie KAYE und DONN.

Gemessen wurden die Aktivitäten der gleichen Enzyme wie beim Epithel, nämlich T-IDH, MDH, GOT, 6-PGDH, G-6-PDH und AdK, zuzüglich der D-IDH und der GPT. Versuchstiere waren Schweine und Kaninchen. Die Messung menschlicher Endothelien war wegen der geringen Menge an Gewebe bei immer nur einem zur Verfügung stehenden Bulbus nicht möglich.

a. Schwein

In der Tab. 8 sind die Ergebnisse der Enzymbestimmungen neben dem anderen Spezies Kaninchen eingetragen. Die Relationen der einzelnen Enzymaktivitäten zueinander sind in Abb. 5 wieder in Form von Enzymverteilungs-

mustern dargestellt. Außerdem sind die Ergebnisse von R. MAIER von der Bestimmung der glykolytischen Enzyme in Tab. 11 und Abb. 8 wiedergegeben. Tab. 11 zeigt, daß auch im Endothel die Enzyme der Glykolyse die relativ höchsten Aktivitäten aufweisen, sie liegen aber zum großen Teil um die Hälfte niedriger als beim vergleichbaren Schweineepithel (s. Abb. 8). Bei den Untersuchungen des Endothels der Schweinehornhaut wurde auch die D-IDH gemessen. Sie ließ sich nicht oder nur in geringen Spuren nachweisen. Da GOEBELL und KLINGENBERG die DPN-abhängige IDH den Mitochondrien zugeordnet haben, erscheint es wahrscheinlich, daß die Zerstörung der Mitochondrien bei der Homogenisierung methodisch nicht zufriedenstellend gelungen ist.

Die T-IDH ist in ihrer Aktivität um den Faktor 10 niedriger als im Epithel der Schweinehornhaut, während die MDH etwa den gleichen Wert hat wie im Epithel.

Von den Transaminasen konnte die GPT nicht nachgewiesen werden, während die Aktivität der GOT im Vergleich zum Epithel im Endothel nur halb so hoch war. Aus den Werten der 6-PGDH und der G-6-PDH ist zu schließen, daß dem Stoffwechselweg über den Hexose-Phosphat-Shunt im Endothel weniger Bedeutung zukommt als im Epithel. Die AdK zeigt gegenüber dem Epithel nur 20 % der dort gefundenen Aktivität.

b. Kaninchen

Aus technischen Gründen mußten größere Reihenuntersuchungen an Hornhautendothelien von Kaninchen unterbleiben, so daß die Zahl der Messungen auf 1 bzw. 2 beschränkt blieb. Es zeigte sich, daß auch im Kaninchenendothel die Aktivitäten der Enzyme zum Teil erheblich niedriger lagen als im Hornhautepithel. Das läßt sich sowohl für die Enzyme der Glykolyse (Werte von R. MAIER in Tab. 11

und Abb. 7), des Citronensäurecyklus als auch des Hoxose-Phosphat-Shunts sagen. Lediglich die GOT macht eine Ausnahme, ihr Wert lag im Endothel etwas höher. Die Werte sind in Tab. 8 und Abb. 5 niedergelegt bzw. graphisch dargestellt. Der Vergleich zwischen den Endothelwerten von Schwein und Kaninchen zeigt (Abb. 5), daß sie im wesentlichen übereinstimmen, ausgenommen die Aktivitäten der MDH, die sich fast um eine Zehnerpotenz unterscheiden. Man kann somit annehmen, daß die Vorgänge im Energiestoffwechsel des Hornhautendothels dieser beiden Spezies sowohl qualitativ als auch quantitativ sehr ähnlich ablaufen.

3. Einige Enzymaktivitäten der Schweinehornhaut bei verschiedenen Extraktionsbedingungen

a. Extraktion in anderem Medium

Im Rahmen der Messungen der Enzymaktivitäten von Endothelien der Schweinehornhaut wurde versucht zu erfahren, ob unterschiedliche Extraktionsmedien bzw. Verfahren veränderte Enzymaktivitäten bedingen. Die Ergebnisse einiger Enzyme bei den verschiedenen Methoden sind in Tab. 9 gegenübergestellt. Es wurden dabei die Werte der Messungen von R. MAIER mitaufgeführt.

Für die Extraktion wurde in allen Versuchen ein 100 mM Na-K-Phosphatpuffer, pH 7,3, verwandt. GOEBELL und KLINGENBERG geben einen Phosphatpuffer mit EDTA, GSH und ADP als besonders geeignet an für die Messung der D-IDH. Obwohl dieser Puffer verwandt wurde, ist es nicht gelungen, eine Aktivität der D-IDH nachzuweisen, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß ihre Aktivität in unserem Extrakt einfach zu gering war. Die Werte aller anderen Enzymaktivitäten zeigten bei der Extraktion in diesem Extraktionsmedium meist gleich hohe, bei einzelnen

Tab. 8 Enzymaktivitäten im Hornhautendothel in IE/g_{frisch}
 von Schwein und Kaninchen; Mittelwert und Standard-
 abweichung der Mittelwerte ($M \pm S_M$)
 n = Zahl der Untersuchungen

Enzyme	Schwein			Kaninchen	
	M	n	S_M	M	n
D-IDH	$0 \frac{n}{n}$ ¹⁾	2	-	nicht getestet	
T-IDH	0,39	13	$\pm 0,045$	0,92	2
MDH	200	13	$\pm 23,7$	27,0	2
GOT	1,19	12	$\pm 0,15$	1,4	2
GPT	$0 \frac{n}{n}$	5	-	$0 \frac{n}{n}$	4
6-PGDH	0,34	13	$\pm 0,038$	0,55	1
G-6-PDH	0,27	11	$\pm 0,035$	0,2	1
AdK	4,6	9	$\pm 0,517$	1,05	2

1) $0 \frac{n}{n}$ = nicht nachweisbar

Enzymen aber eher niedrigere Werte, niemals wesentlich höhere. Daraus ergibt sich, daß der Phosphatpuffer als Extraktionsmedium für die hier untersuchten Enzyme geeignet ist.

b. Messungen im "Gesamthomogenat"

Bei den Messungen im Gesamthomogenat gingen wir davon aus, daß uns im abzentrifugierten Niederschlag von Gewebspartikeln unter Umständen ein Teil der Enzymaktivitäten verloren gehen könnte. Der erste Versuch, auf die Zentrifugation ganz zu verzichten und den Extrakt nach dem Extrahieren un zentrifugiert der Cuvette im Photometer zuzusetzen, schlug aus zwei Gründen fehl. Bei größeren Einsätzen des milchigen Gewebsextraktes war die Extinktion durch die Trübung so groß, daß eine Messung nicht mehr möglich war. Waren die Einsätze kleiner, so daß eine Messung hätte erfolgen können, änderte sich die Extinktion nicht nur durch die chemischen Umsetzungen, sondern auch durch das langsame Absetzen der größeren Partikel auf dem Boden der Cuvette. So führten wir dann eine gemäßigte Zentrifugation als in den sonstigen Untersuchungen durch.

Bei dem "Gesamthomogenat 1" wurde 15 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Der rauchig trübe Überstand wurde getestet. Bei "Gesamthomogenat 2" wurde 3 Minuten bei 500 U/min zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Um eine möglichst optimale Extraktion zu erreichen, wurde das Sediment erneut extrahiert und zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und getestet. Auch dieser Extrakt war rauchig trüb. Die Tab. 9 zeigt, daß sich so gut wie keine Änderungen in den gemessenen Enzymaktivitäten gegenüber unserer Standardmethode ergaben. Der niedrige Wert der PK im "Gesamthomogenat 1" könnte auf Hemmungsmechanismen beruhen. Diese Ergebnisse lassen die Folgerung zu,

Tab. 9 Einige Enzymaktivitäten des Endothels der Schweinehornhaut bei verschiedenen Extraktionsverfahren⁺
Int. Einh. (n Mol/g feucht/min)

Medien	LDH	AID	6-PGDH	G-6-PDH	D-IDH	TIM	MDH	GOT	AdK	PK	IDH	GMP	GLDH	GPT	F-6-PK
A	192	2,5	0,3	0,5	-	310	225	2	4,8	40	0,4	55	0,15	0	1,8
B	141	2	0,4	0,3	0	-	126	1	3,8	26	0,4	47	0,06	0	1,2
C	130	3,3	0,4	0,26	-	325	140	1,0	-	4,2	0,3	60	-	0	3,3
D	83	2,3	0,2	0,2	-	358	155	1	3,8	-	0,3	8,6	0,06	0	1,3
E	225	2,8	0,65	-	-	-	400	1,5	0	-	0,74	15	0,1	-	0

+ Diese Tabelle enthält Werte von R. MAIER und dieser Arbeit

A	Na-K-Phosphatpuffer pH 7,3 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$	C	"Gesamthomogenat" 1 Phosphatpuffer pH 7,3 100 mM	E	Homogenisation mit Ultraturrax
B	100 mM Phosphatpuffer pH 7,2 2 mM EDTA 100 mM GSH 1 mM ADP nach GOEBELL und KLINGENBERG	D	"Gesamthomogenat" 2 Phosphatpuffer pH 7,3 100 mM		

daß eine Haftung der von uns getesteten Enzyme an die Gewebsbruchstücke nur unwesentliche Ausmaße erreicht, wobei natürlich die intramitochondrialen Enzyme ausgeklammert werden müssen. Es kann angenommen werden, daß sich bei der im methodischen Teil angegebenen Extraktionsmethode die nicht partikulären Enzyme alle im klaren Überstand des Zentrifugates befinden.

c. Homogenisieren mit Ultraturrax

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob eine Homogenisation mit dem Ultra-Turrax der Fa. JANKE und KUNKEL, Staufen i.Br., gegenüber dem Verfahren mit dem Glas-in-Glas-Homogenisator irgendwelche Veränderungen bei den Enzymaktivitäten hervorrufen würde. Das frisch gewogene Gewebe wurde im Eisbad 8 x 15 sec bei 24 000 U/min des Ultra-Turrax homogenisiert. Es fiel auf, daß durch den Turrax viele Gewebspartikel an den Rand des Gefäßes, in dem homogenisiert wurde, geschleudert wurden, die somit bei der Homogenisation nicht erfaßt wurden. Die anschließend gemessenen Werte der Enzymaktivitäten sind in Tab. 9 wiedergegeben, wobei eine leicht erhöhte LDH und MDH auffallen. Auch der Wert der 6-PGDH liegt etwas höher als bei den vergleichbaren Werten. Erniedrigt ist die Aktivität der GPM. Erstaunlich ist, daß die AdK und die F-6-PK überhaupt nicht nachgewiesen werden konnten. Somit brachte diese Art der Homogenisation, wahrscheinlich aufgrund einer für die Homogenisation mit dem Ultra-Turrax zu geringen Gewebseinwaage, keinesfalls eine Verbesserung. Aufgrund all dieser Messungen, die in Tab. 9 im Vergleich wiedergegeben sind, bestand keine Veranlassung, das Extraktionsverfahren, wie es im methodischen Teil beschrieben ist, zu ändern.

d. Messung partikulärer und zytoplasmatischer Enzyme im Gesamthomogenat

In einem weiteren Versuch wurden die partikulären Enzyme SuccDH, GPOx und die zytoplasmatischen Enzyme GLDH, HK und GOT in einem echten Gesamthomogenat gemessen. Es wurde gewonnen, indem Epithel bzw. Endothel der Schweinehornhaut mit dem Puffer TRAP/Saccharose 5 x 30 sec in einem Glas in Glas-Homogenisator und dann 4 x 20 sec im Ultra-Turrax homogenisiert wurde. Dieses so gewonnene Homogenat brachte nicht die Schwierigkeiten wie das im oben beschriebenen Versuch der Fall war, weil im saccharose-haltigen Medium mit größerer Dichte die Partikel weniger rasch in der Cuvette sedimentieren und somit eine optisch stabile Suspension hergestellt wurde. Bei der SuccDH und GPOx ist eine Messung im Gesamthomogenat unerlässlich, da es sich um partikuläre Enzyme handelt, d.h., diese Enzyme sind in einer Struktur der Mitochondrien gebunden und gehen nicht oder nur zum kleinen Teil in Lösung. Die gefundenen Aktivitäten (s. Tab. 10) dieser beiden Enzyme können nur als Schätzung gewertet werden, da nicht sicher ist, ob eine ausreichende Zerkleinerung der Mitochondrien bei dieser Methode gelungen ist. Im Endothel lagen die gemessenen Werte der SuccDH ca. 10 x niedriger als im Epithel. Das ist bei der hohen Mitochondrienzahl des Endothels zumindest überraschend. Dieser Befund lässt sich durch diese rein orientierenden Untersuchungen bei den technisch begrenzten Möglichkeiten der Photometrie mit dem "EPPENDORF" Gerät nicht klären. Vergleicht man den gemessenen Wert der GOT mit dem bei dem im Rahmen dieser Untersuchungen sonst üblichen Extraktionsverfahren, so lässt sich eine gute Übereinstimmung feststellen (s. Tab. 4). Die Werte der GLDH und HK lassen sich gut mit den Ergebnissen der anderen Spezies aus der Literatur (s. Tab. 1) vergleichen, es liegen keine wesentlichen Unterschiede vor.

Tab. 10 Partikuläre und zytoplasmatische Enzyme
im Epithel der Schweinehornhaut in IE/g^{frisch};
gemessen im Gesamthomogenat.

SuccDH	GPOx	GLDH	HK	GOT
0,42	0,13	0,24	0,97	2,63
n = 3	n = 3	n = 2	n = 3	n = 2

V. Diskussion

Gegenüberstellung von Epithel und Endothel

1. Vergleiche hinsichtlich der Aktivitäten

Legt man die Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeit von R. MAIER (s. Tab. 1, 7, 8, 11) für einen Vergleich der Enzymaktivitäten von Epithel und Endothel zugrunde, so läßt sich grundsätzlich sagen, daß sowohl im Epithel als auch im Endothel die Stoffwechselwege der Glykolyse, des Citronensäurecyklus, und des Hexose-Phosphat-Shunts ablaufen können. Im Endothel scheint allerdings der oxydative Abbau der Glukose über den Hexose-Phosphat-Shunt von geringerer Bedeutung zu sein als im Epithel. Die Transaminase GOT war in geringen Konzentrationen nachzuweisen, die GPT überhaupt nicht. Die AdK erreichte besonders im Schweineepithel und Endothel recht hohe Werte.

Vergleicht man die Enzymaktivitäten der Hornhautepithelien der beiden Spezies Schwein und Kaninchen, so ist festzustellen, daß außer der LDH, deren Werte beim Kaninchen etwa um den Faktor 10 höher lag, die Aktivitäten der Enzyme in der gleichen Größenordnung lagen (s. Tab., 1, 7 u. Abb. 6,7,8,9). Die Ergebnisse der menschlichen Hornhautepithelien zeigten gegenüber diesen beiden Spezies keine wesentlichen Abweichungen.

Beim entsprechenden Vergleich der Endothelwerte zeigte sich auch hier Übereinstimmung, mit den Ausnahmen PK, MDH und LDH, deren Aktivitäten im Endothel der Schweinehornhaut doch wesentlich höher lagen als beim Kaninchen (s. Tab. 8, 11 u. Abb. 5, 7, 9).

Beim Vergleich von Epithel und Endothel fällt auf, daß außer wenigen Ausnahmen die Werte der Enzymaktivitäten des Endothels erheblich niedriger lagen als die des Epithels, sowohl beim Schwein, als auch beim Kaninchen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, nochmals zu

Tab. 11 Enzymaktivitäten im Hornhautendothel
 von Schwein und Kaninchen in IE/g frisch;
 nach R. MAIER (1967) ¹⁾

Spezies	LDH	GDH	ALD	TIM	GAPDH	PGK	GLDH	GPM	F-6-PK	PK
Schwein	160	0,24	2,5	311	40	84	0,1	43,9	1,5	22,9
Kaninchen	38,7	0,36	3,1	224	40,8	71,2	0,13	21,4	2,3	3,5

- 1) Diese Messungen wurden parallel zu denen dieser Arbeit durchgeführt.

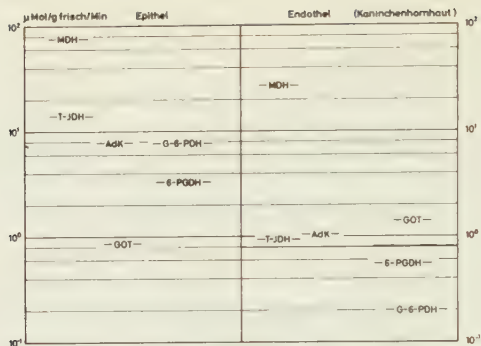


Abb. 6 Gegenüberstellung der Enzymverteilungsmuster von Hornhautepithel und Endothel der Kaninchenversuche

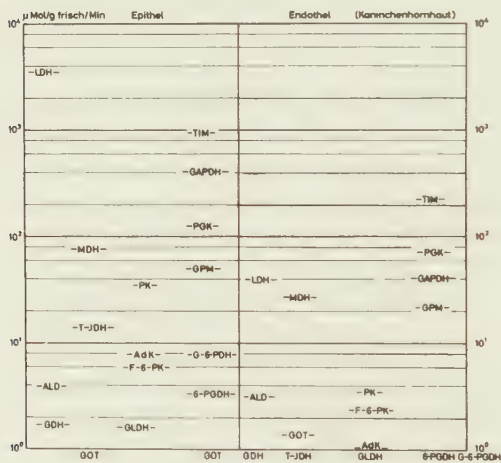


Abb. 7 Gegenüberstellung der Enzymverteilungsmuster von Hornhautepithel und Endothel der Kaninchenversuche mit den Werten von R. MAIER, die parallel zu denen dieser Arbeit ermittelt wurden.

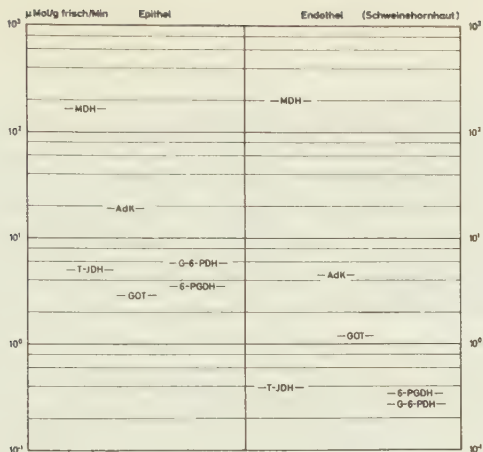


Abb. 8 Gegenüberstellung der Enzymverteilungsmuster von Hornhautepithel und Endothel der Schweineversuche

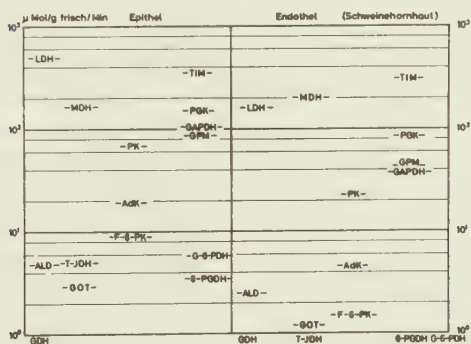


Abb. 9 Gegenüberstellung der Enzymverteilungsmuster von Hornhautepithel und Endothel der Schweineversuche mit den Werten von R. MAIER, die parallel zu denen dieser Arbeit ermittelt wurden.

erwähnen, daß auch der Proteingehalt des Endothelextraktes wesentlich unter dem des Epithels lag (s. Tab. 3). Die Ausnahmen bildet beim Schwein die MDH, die sowohl im Epithel als auch im Endothel etwa gleich hohe Werte erreicht, während beim Kaninchen der Wert der GOT im Endothel fast doppelt so hoch war wie im Epithel. Einen Größenunterschied Epithel-Endothel um etwa den Faktor 10 fanden wir beim Schwein bei : T-IDH, 6-PGDH, G-6-PDH; 2 - 4 x höher liegt der Wert im Epithel bei : LDH, GDH, ALD, GAPDH, PGK, GPM, F-6-PK, PK, GOT und AdK. Beim Kaninchen beträgt der Faktor zwischen LDH-Aktivität im Epithel und Endothel sogar 100, der Faktor 10 wird erreicht bei : GAPDH, T-IDH, PK, 6-PGDH. Noch größer ist der Faktor von der G-6-PDH im Epithel und Endothel.

Bezieht man die Enzymaktivitäten nicht auf das Frischgewicht des Gewebes, sondern auf die oben angeführten Mengen an extrahierbarem Protein, so ist festzustellen, daß sich die Enzymaktivitäten von Epithel und Endothel bei dieser Bezugsgröße kaum mehr unterscheiden. Fast alle liegen in der gleichen Größenordnung außer der AdK, deren Wert im Schweinepithel um das zehnfache höher ist als im Endothel. Das läßt darauf schließen, daß die zytoplasmatische Leistung im Epithel und Endothel als solche gleich, und nicht, wie man mikroskopisch-anatomisch vermuten könnte, im Endothel trotz geringeren Zytoplasmas höher ist als im Epithel.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Kapazität der energieliefernden Stoffwechselwege im Endothel nicht den Wert des Epithels erreichen, wenn sie auf das Frischgewicht bezogen wird. Die Bezugsgröße ist also für Epithel und Endothel gleich. Da der Gewebsanteil des Endothels gegenüber dem Epithel in der Hornhaut wesentlich geringer ist, dürfte der absolute Unterschied der beiden Stoffwechselraten noch größer sein, als es die

gegenübergestellten Ergebnisse anzeigen. Diese Schlußfolgerung müßte durch Metabolitbestimmungen allerdings noch bestätigt werden. Dies scheint jedoch die Befunde von KIKKAWA und GREEN (s. Einleitung) zu unterstützen, wonach die Energie für den aktiven Transport von Ionen aus dem Stroma in das Kammerwasser hauptsächlich vom Epithel produziert wird.

2. Vergleich der Aktivitäten von Epithel und Endothel in Bezug auf die Ultrastruktur

Anhand der ultramikroskopischen Befunde (s. Einleitung) kann man erwarten, daß die Aktivitäten der mitochondrialen Enzyme im Endothel der Hornhaut höher sein müssen als im Epithel. Der Beweis dieser Annahme ist in dieser Arbeit nicht gelungen, und zwar wahrscheinlich aus methodischen Gründen. Die obligat mitochondrialen Enzyme, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, sind die D-IDH, SuccDH, und GPOx. Die D-IDH, die nur im Endothel gemessen wurde, war nicht, oder nur in ganz geringen Spuren nachweisbar. Die SuccDH war im Epithel etwa 10 x so hoch wie im mitochondrienreichen Endothel. Es ist daher fraglich, ob bei diesen geringen Mengen an Gewebe, die uns gerade bei der Untersuchung des Endothels zur Verfügung standen, überhaupt eine Zerstörung der Mitochondrien gelungen ist. Gültige Aussagen darüber bleiben Untersuchungen mit anderen Präparationsmethoden vorbehalten. Die Zellfraktionierung in Mikrosystemen würde über den Rahmen des Themas dieser Arbeit hinausgehen. Nur nach guter Abtrennung und Anreicherung der Mitochondrien lassen sich Aussagen über die mitochondrialen Enzyme machen.

Die Frage, ob die geringere Kapazität der zytoplasmatischen Enzyme im Endothel auf einen relativ größeren Anteil der mitochondrialen Enzyme hindeutet, wäre durch solche Untersuchungen dann zu klären. Der Schwerpunkt dieser

Arbeit liegt auf der Bestimmung der zytoplasmatischen Enzyme, um erst einmal eine Richtung zu weisen. Für die TPN-spezifischen Dehydrogenasen ist in den letzten Jahren von mehreren Arbeitskreisen wahrscheinlich gemacht worden, daß sie in einer Reihe von Syntheseketten als Wasserstoff-Donatoren fungieren (BÜCHER, KLINGENBERG). Da PRAUS und OBERBERGER aufgrund ihrer Versuche dem Hornhautepithel im Gegensatz zum Endothel eine gewisse Synthesefunktion zugesprochen haben (s. Einleitung), und zudem das Endoplasmatische Reticulum und der Golgi-Apparat im Hornhautepithel ausgesprochen gut entwickelt sind (JAKUS, TENG, PEDLER), liegt ein Vergleich der von uns getesteten Enzymaktivitäten der TPN-spezifischen Dehydrogenasen in Epithel und Endothel nahe. Es handelt sich um die Enzyme T-IDH, G-6-PDH und 6-PGDH. Tab. 7 und 8 zeigen, daß die Aktivitäten dieser Enzyme im Epithel um eine Größenordnung höher liegen als im Endothel. Dieser Befund stützt die Annahme, daß im Epithel neben der Sekretion auch Synthesen stattfinden, und im Endothel mehr oder nur sekretorische Leistungen vollzogen werden.

3. Vergleich von Epithel und Endothel hinsichtlich der Substratoptima und Michaelis-Konstanten

Die im Epithel und Endothel gemessenen Michaelis-Konstanten zeigten bei der Gegenüberstellung derselben Substrate zum Teil unterschiedliche Größen. Es zeigte sich jedoch auch, daß der Bereich der Substratoptima jeweils sehr groß war (s. unter den Testvorschriften), so daß die in den Testvorschriften angegebenen Molaritäten der Substrate sowohl für die Messungen des Epithels als auch des Endothels angewandt werden konnten, mit Ausnahme des Substrates der MDH. Die zum Teil unterschiedlich hohen Werte der Michaelis-Konstanten in beiden Geweben spielten daher bei unseren Messungen praktisch keine Rolle. Sie lassen aber die Möglichkeit offen, daß sich die gleichen Enzyme in Epithel und Endothel unterscheiden.

VI. Zusammenfassung

Um die Wege des Energiestoffwechsels im Epithel und Endothel der Cornea näher kennenzulernen, wurden mit Hilfe enzymatisch-optischer Methoden Bestimmungen einiger Enzymaktivitäten des Energiestoffwechsels, zweier Transaminasen und der AdK im Hornhautepithel und -endothel der Spezies Schwein, Kaninchen und Mensch vorgenommen.

1. Die Testmethoden wurden durch kinetische Versuche zur Bestimmung der Substratoptima und der Michaelis-Konstanten überprüft und den Gegebenheiten der speziellen Gewebe angepaßt. Es zeigte sich anhand der verschiedenen Werte für die Michaelis-Konstanten, daß sich die gleichen Enzyme in Epithel und Endothel unterscheiden können. Folgende Enzyme wurden getestet: D-JDH, T-JDH, MDH, GOT, GPT, 6-PGDH, G-6-PDH, AdK.

2. Grundsätzlich konnte festgestellt werden, daß sowohl im Hornhautepithel als auch im Endothel aller Spezies die Stoffwechselwege der Glykolyse, des Citronensäurecyklus und des Hexose-Phosphat-Shunts ablaufen können. Die Transaminase GOT war in geringen Konzentrationen, die GPT überhaupt nicht nachweisbar. Recht hohe Werte erreichte die AdK. Auffallenderweise lagen die Aktivitäten der TPN-spezifischen Enzyme T-JDH, G-6-PDH, 6-PGDH im Epithel rund 10 x höher als im Endothel.

3. Die einzelnen Enzymaktivitäten des Hornhautepithels lagen bei allen 3 Spezies überwiegend in der gleichen Größenordnung, was auch für die Werte des Hornhautendothels von Schweinen und Kaninchen zutrifft.

4. Durch Änderung der Verfahren zur Gewebserkleinerung und der Extraktionsmedien war kein Einfluß auf die Höhe der gemessenen Enzymaktivitäten festzustellen.

5. Die Werte für das Cornea-Epithel von Menschen zeigten bei den untersuchten Enzymen keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Aktivitäten von Kaninchen und Schweinen. Das veranlaßte uns, an Kaninchenversuchen eine etwaige Induktion der ausgewählten Enzyme durch Prednisolon-trimethylacetat hervorzurufen, was auch bei 16 tägigem Tropfen von Ultracortenol-Augentropfen in den Coniunctival-sack nicht nachzuweisen war.
6. Beim Vergleich der auf das Frischgewicht des Gewebes bezogenen Enzymaktivitäten von Epithel und Endothel fiel auf, daß außer wenigen Ausnahmen die Werte der Enzymaktivitäten des Endothels bei allen Spezies erheblich niedriger lagen als die des Epithels. Die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Energieproduktion in der Cornea im Hinblick auf den aktiven Transport von Wasser und Ionen aus dem Stroma in das Kammerwasser wurde diskutiert.
7. Wurden die Enzymaktivitäten auf das extrahierbare Protein bezogen, so lagen die Aktivitäten im Epithel und Endothel etwa gleich hoch, die Kapazität der zytoplasmatischen Enzyme von Epithel und Endothel - bezogen auf die Einheit des zytoplasmatischen Raumes - dürfte als solche somit in beiden Geweben gleich sein.
8. Aufgrund der Höhe der Aktivitäten der TPN-spezifischen Enzyme ist anzunehmen, daß im Epithel neben der Sekretion auch Synthesen stattfinden, und im Endothel mehr oder nur sekretorische Leistungen vollzogen werden.

A n h a n g

Tabellen der Einzelwerte

Tab. 1 Enzymaktivitäten im Hornhautepithel von Schweinen (IE/g frisch)

Lfd. Nr.	T-JDH	MDH	GOT	6-PGDH	G-6-PDH	AdK
1		115	2,65			16,9
2		97,2	2,8			16
3		174	3,79			14,7
4	4,9	89	2,52	3,3	5,68	15,2
5	4,4	97,5	2,38	2,47	4,6	17,9
6	4,7	218	2,86	3,4	5,5	18,0
7	4,8	134	2,08	3,3	5,3	15,6
8	4,2	82,5	2,12	3,3	5,0	
9	5,6	120	2,62		5,03	
10	4,4	94	3,8		4,34	
11	11,9	295	6,3		14	31
12	4,3	134	1,7		5,5	16,7
13	4,8		3,4			23
14	3,6		1,9			15
15	5,5		2,5		6,0	22
16	3,2		2,7		4,7	14,9
17	4,7	124	3,0	4,8	5,4	20
18	5,0	525	2,5	4,25	5,0	30

Tab. 2 Enzymaktivitäten im Hornhautepithel von Kaninchen (IE/g frisch)

Lfd.Nr.	T-JDH	MDH	GOT	6-PGDH	G-6-PDH	AdK
1	12,3		1,68	2,9	7,8	11,2
2	11,4		0,82	2,5	7,9	7,05
3	12,0		0,43	3,67	8,43	8,6
4	25,3	82,5	1,12	4,67	8,43	
5		67,5	0,51	2,78	6,66	5,1
6	8,1	80	0,62	3,35	7,45	7,5

Tab. 3 Enzymaktivitäten im Hornhautepithel von Menschen (IE/g frisch)

Lfd. Nr.	T-JDH	MDH	GOT	6-PGDH	G-6-PDH	AdK
1	4,53	181	1,23		0,84	5,75
2	9,35	96	0,99	3,9		
3	1,39	250	1,16			
4	4,0	419		13,0	3,0	8,6
5	2,7	410		12,0	2,7	7,0
6	1,9	170	2,5	9,0	3,0	2,9
7	1,34	210	1,3	3,9	2,5	2,5
8	1,3	23,1	3,4	2,2	7,7	5,5
9	3,2	104	4,2	16,1	1,24	6,2
10	3,2	49,4	3,3	8,0	1,12	7,7

Tab. 4 Enzymaktivitäten im Hornhautendothel von Schweinen (IE/gfrisch)

Lfd. Nr.	D-JDH	T-JDH	MDH	GOT	GPT	6-PGDH	G-6-PDH	AdK
1		0,68	255	2,2		0,53		6,6
2		0,42	244	1,5		0,38	0,25	5,4
3		0,2	225	1,2		0,3	0,5	3,2
4		0,34	200	2,0		0,3	0,45	
5		0,74	400	1,5		0,65		
6		0,4	163	0,95		0,27	0,23	2,9
7		0,4	145			0,25	0,25	
8		0,35	140	1,0		0,39	0,26	
9		0,27	155	0,97	0	0,23	0,23	3,8
10	0	0,42	73	0,95	0	0,4	0,3	7,2
11	0	0,16	126	0,82	0	0,24	0,12	3,8
12		0,35	300	0,6	0	0,35	0,25	4,8
13		0,36	176	0,6	0	0,24	0,19	4,0

Tab. 5 Proteingehalt von Hornhautepithel und Endothel in mg/g Frischgewicht von Schweinen
(Biuret-Methode)

Lfd. Nr.	Schwein	
	Epithel	Endothel
1	114	42
2	100	30
3	87,5	14
4	67	12,9
5	72,5	32,5
6	59	30,4
7	55,5	12,1
8	68,5	11,0
9	63,5	

Verzeichnis der Abkürzungen

AdK	Adenylatkinase (Myokinase)
ADP	Adenosindiphosphat
ALD	1,6, di-Phosphofructaldolase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
D-IDH	Diphosphopyridinnucleotid-oxidiert-abhängige Isocitronensäure-Dehydrogenase
DPN	Diphosphopyridinnucleotid-oxidiert
DPNH	Diphosphopyridinnucleotid-reduziert
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
ENO	Enolase
F ⁶ -6-P	Fructose-6-Phosphat
F-6-PK	Fructose-6-Phosphatkinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPM	Phosphogluceronutase
GPOx	Glycerin-Phosphat-Oxydase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSGDH	Glutathionreduktase
G-1-P	Glukose-1-Phosphat
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HIM	Phosphohexoseisomerase
HK	Hexokinase
IC	Isocitrat
α -KG	α -Ketoglutarsäure
K _M	Michaelis-Konstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase
L/P	Lactat/Pyruvat
MDH	Malat-Dehydrogenase
Na-Succ	Natrium-Succinat

OAA	Oxalessigsäure
PEP	Phosphoenol-Pyruvat
6-PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
6-PGS	6-Phosphogluconat
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PK	Pyruvatkinase
Succ DH	Succinat-Dehydrogenase
TCA	Trichloressigsäure
T-IDH	Triphosphopyridinnucleotid-oxidiert-Iso- citronensäure-Dehydrogenase
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TPN	Triphosphopyridinnucleotid-oxidiert
TRAP	Triäthanolamin-Hydrochlorid

Literaturverzeichnis

- BEISENHERZ, G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, Th., CZOK, R.,
GARBADE, K.H., MEYER-ARENDT, E., PFLEIDERER, G.
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceralde-
hyd-Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase,
Glycerophosphat-Dehydrogenase u. Pyruvatkinase
aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. f. Naturforschung 8, 6, 555, 1953
- BÜCHER, Th., LUH, W., PETTE, D. Einfache und zusamme-
gesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden
Handbuch der physiologisch-u. pathologisch-
chemischen Analyse, 10. Aufl., B VI, Teil A,
S. 292, Springer Verl. Berlin, Göttingen,
Heidelberg, New York 1964
- BÜCHER, Th., KLINGENBERG, W. Wege des Wasserstoffs in der
lebendigen Organisation, Angewandte Chemie,
70. Jahrg. Nr. 17/18, 1958; Zeitschrift "Die
Chemie, Verl. Chemie GMBH, Weinheim/Bergstr.
- CALMETTES, L., DEODATI, F., PLANEL, H., BEC, P. Etude
histologique et histochemique de l'épithelium
antérieur de la cornée et de ses basales
Arch. Ophthal., Paris 16, 481, 1956
- DAVSON, H. Some considerations on the salt content of the
fresh and old ox cornea. Brit. J. Ophthal. 33,
175, 1949. Zit. in PIRIE, A., HEYNINGEN R. v.
Biochemistry of the Eye, Blackwell ci. Publ.
Oxford 1956, S. 151 ff.
- DAVSON, H. The Eye, Bd. 1, Vegetative Physiology and Bio-
chemistry, Academic Press, London, New York 1962
- DAVSON, H. "The intra-ocular fluids" In: The Eye, Bd. 1,
Vegetative Physiology and Biochemistry, Edit.
H. Davson, Academic Press London, New York 1962
- DELBRÜCK, A. Enzymverteilungsmuster gefäßloser Gewebe
Klin. Wschr. 41, 488, 1963

- DONN, A., MAURICE, D. M., MILLS, N. L. Studies on the living cornea in vitro II: The active transport of sodium across the epithelium. Arch. Ophthalm. Y. 62, 741, 1959. Zit. von D.M. Maurice in The Eye, Edit. H. Davson, Academic Press, 1962, London, New York, S. 332
- DRAEGER, J. Vortrag auf der Tagung der Berliner Augenärztlichen Gesellschaft am 3.12.66.
- DÜKE-ELDER, W. S., PERKINS, R. S. The transparency of the cornea, Blackw. Sci. Publ. Oxford 1960
- EWALD, W., HÜBENER, H. J., WIEDEMANN, E. Weitere Untersuchungen über Enzyminduktion mit Cortisol in der Leber, H.S.Z., 333, 57, 1963
- FRENCH, R. C., DUMA, Z. Studies on protein metabolism of the cornea I: The distribution of nitrogenous solids in rabbit corneas. Canad. J. Biochem. 41, 1005, 1963
- GELLER, E., YUWILER, A., SHAPIRO, S. Comparative Effects of a Stress and Cortisol upon some Enzymic Activities. Biochem. Biophys. Acta, 93, 311-315, 1964
- GOEBELL, H., KLINGENBERG, M. DPN-spezifische Isocitratdehydrogenase der Mitochondrien I Kinetische Eigenschaften, Vorkommen und Funktion der DPN-spezifischen Isocitratdehydrogenase Biochem. Z. 340, 441, 1964
- GREEN, K. Ion transport across the isolated rabbit cornea, Exp. Eye Res. 5, 106, 1966
- HANNA, C., O'BRIEN, J. E. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. Arch. Ophthalm. N.Y. 64, 536, 1960. Zit. von Maurice. D. M. in "The cornea and sclera" in The Eye, Edit. by H. Davson, Academic Press, London, New York, 1962.
- HARRIS, J. E. The physiologic control of the corneal hydration. Amer. J. Ophthalm. 44, 262, 1957

- HOHORST, H. J., KREUTZ, F. M., REIM, M., HÜBENER, H. J.
The Oxidation/Reduction state of the extra-mitochondrial DPN/DPNH System in rat liver and the hormonal control of substrate levels in vivo; Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 163, 1961
- HOLT, C. v., LÜTH, H., HALLMANN, I., HOLT, L. v., VOELKER, L.
Die Oxydation 1-¹⁴C- Glukose und 6-¹⁴C- Glukose in Cornea, Linse u. Retina
Biochem. Z. 331, 239, 1959
- IWAMOTO, T., SMELSER, G. K., Electron Microskopie of the Human Corneal Endothelium with Reference to Transport Mechanism. Investigate Ophthal., Vol. 4, Nr. 3, 1965, St. Louis
- JAKUS, M. A. "The fine structure of certain ocular tissues" 4. Int. Kongress für Elektronenmikroskopie 1958 Verhandlungen. Herausgegeben: Bargmann, Möllstedt, Niehrs, Peters, Ruska, Wolpers, Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960, S. 334
- JAKUS, M. A. "The fine structure of the human cornea" In: The structure of the eye. Edit. G. K. Smelser, Academic Press N.Y., London 1961, S. 343
- KADENBACH, B. Der Einfluß von Thyreoidhormonen in vivo auf die oxydative Phosphorylierung und Enzymaktivitäten in Mitochondrien, Dissertation phil. Marburg 1964, S. 61/62
- KAWERAU, E., OTT, H. The soluble Proteins of the Cornea. Paper and Immunelectro-phoretic Studies. Exp. Eye Res. 1, 137, 1961
- KAYE, G. I., DONN, A. Some Effects of Quabain on Pinocytosis and stromal Thickness in the Rabbit cornea. Investigate Ophthal. Vol. 4, Nr. 5 Okt. 1965 St. Louis

- KAYE, G. I., PAPPAS, G. D. Studies on the cornea I: Fine structure of the rabbit cornea and the uptake and transport of colloidal particles by the cornea in vivo. *J. Cell. Biol.* 12, 457, 1962
- KIKKAWA, Y. Corneal potential studied on whole eye. *Exp. Eye Res.* 5, 21, 1966
- KINOSHITA, J. H., MASURAT, T. The direct oxidative carbohydrate cycle of bovine corneal epithelium. *Arch. Biochem. Biophys.* 53, 9, 1954
- KINOSHITA, J. H., MASURAT, T. Aerobic pathway of glucose metabolism in bovins corneal epithelium. *Amer. J. Ophthalm.* 48, II, 47, 1959
- KUHLMAN, R. R. Species variation in the enzyme content of the corneal epithelium. *J. Cell. comp. Physiol.* 53, 313, 1959
- KUHLMAN, R. E., RESNIK, R. A. Quantitative histochemical changes in the development of the rat lens and cornea. *Amer. J. Ophthalm.* 46, II, 47, 1958
- LEOPOLD, I. H., SAWYER, J. L., GREEN, H. Intraocular Penetration of Locally Applied Steroids. *A. M. A. Arch. of Ophthalm.* 54, 1955
- MAURICE, D. M. "The cornea and sclera" In *The Eye*, Bd. 1 Edit. H. Davson, Academic Press 1962, London, New York
- PAU, H., CONRAD, H. Die Bedeutung der Langerhans'schen Zellen für die Nerven des Hornhautepithels. *A. v. Graefes Arch. Ophthalm.* 158, 427, 1957
- PEDLER, C. The fine structure of corneal epithelium. *Exp. Eye Res.* 1, 286, 1962
- PETTE, D., LUH, W. Constant-proportion groups of multi-located enzymes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 8, 283, 1962
- PETTE, D., BÜCHER, Th., Constant-proportion groups of Enzymes of Embden-Meyerhof-Chain *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 419, 1962

- PETTE, D., BÜCHER, Th. Proportionskonstante Gruppen in Beziehung zur Differenzierung der Enzym-Aktivitätsmuster von Skelett-Muskeln des Kaninchens. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 331, 180, 1963
- PIRIE, A., HEYNINGEN, R. v. Biochemistry of the eye Blackwell Sci. Publ. Oxford 1956
- PRAUS, R., OBERNBERGER, J. The importance of epithelium in the incorporation of radioactive sulphate into the acid mucopolysaccharides of isolated cornea. Ref. in Ophthal. Lit. 18, 52/53, 1964 Cs. Ophthal. 20, 1964, S. 13 - 26
- REIM, M., SCHRAMM, H. P. Beitrag zur biochemischen Wirkung des IUDR auf die Hornhaut. A. v. Graefes Arch. f. Ophthal. 168, 365, 1965
- REIM, M., LICHTÉ, H. Beziehung zwischen Energiestoffwechsel und Hornhauttrübung. A. v. Graefes Arch. f. Ophthal. 168, 365, 1965
- REIM, M. Habilitationsschrift, Marburg 1966
- RHODIN, J. A. G. An atlas of ultrastructure. W. B. SAUNDERS Company Philadelphia, London 1963
- ROHEN, J. W. Das Auge und seine Hilfsorgane. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen Bd. 3: Haut- und Sinnesorgane, 4. Teil, Springer Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York 1964
- SCHWARZ, W. "Electron microscopical studies of the fibrillogenesis in the human cornea." In: The structure of the eye. Edit. G. K. Smelser Academic Press 1961, New York, London S. 393
- SERGIO ESTRADA, O., CORDOBALA, F. Cortisol Activation of Rat Liver Glutamate-Aspartate-Transaminase Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 12, Nr. 6, 1963

- STRAUB, W., SAUTTER, H., VELTEN, H. Experimentelle und klinische Befunde nach Verletzungen der Hornhautrückfläche. A. v. Graefes Arch. Ophthal. 160, 26, 1958
- TENG, C. C. The fine structure of the corneal epithelium and basement membrane of the rabbit. Amer. J. Ophthal. 51, 278, 1961
- VIRCHOW, H. Mikroskopische Anatomie der äußeren Augenhaut und des Lidapparates. Handbuch der gesamten Augenheilkunde. 2. Aufl., 1. Bd., herausgeg. von Th. Saemisch, 1910, 1. Abt., W. Engelmann. Leipzig.

Lebenslauf

Am 16.2.1943 wurde ich als Sohn des Studienrates Kurt Hildebrandt und seiner Ehefrau Maria, geb. Dietrich, in Presberg/Rheingau geboren.

Ab Herbst 1949 besuchte ich die Volksschule in Geisenheim/Rhein, ab Ostern 1952 das Rheingaugymnasium in Geisenheim. Ab Ostern 1955 besuchte ich die König-Heinrich-Schule in Fritzlar. Ostern 1961 bestand ich am neusprachlichen Zweig dieses Gymnasiums die Reifeprüfung.

Vom Sommersemester 1961 bis zum Wintersemester 1962/63 studierte ich an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn, vom Sommersemester 1963 bis zum Sommersemester 1964 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Nach drei Semestern bestand ich das Vorphysikum, nach drei weiteren Semestern das Physikum. Im Wintersemester 1964/65 besuchte ich die Medizinische Akademie in Düsseldorf und kehrte im Sommersemester 1965 zur Philipps-Universität nach Marburg zurück.

Während der Semesterferien famulierte ich an der Chirurgischen Abteilung des Hospitals zum Heiligen Geist in Fritzlar, in der Augenklinik der Philipps-Universität Marburg sowie an der Inneren Abteilung des Burgfeld-Krankenhauses in Kassel.

Das medizinische Staatsexamen legte ich im Wintersemester 1967/68 an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn ab.

Herrn Prof. Dr.med.W. Straub, Direktor der Augenklinik der Philipps-Universität Marburg a.d.Lahn,danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Doz. Dr.med. M. Reim, der mich in die Methodik der Arbeit im biochemischen Labor einführte und darüber hinaus trotz anstrengender Arbeit in der Klinik immer noch Zeit fand, mir - auf Grund seiner Erfahrungen und Kenntnisse auf dem Sektor der Biochemie - wertvolle Ratschläge zu geben.

Der biologisch-technischen Assistentin, Frau H. Cattepoel, sowie der medizinisch-technischen Assistentin, Frau M. Ursprung, danke ich für ihre Assistenz.

Meine akademischen Lehrer waren die Herrn Professoren
und Dozenten:

in Marburg:

Berendes, Bommer, Braun-Falco, Bücher, Buchholz, Dimroth,
Dölle, Drawert, du Mesnil de Rochemont, Exner, Gedigk,
Hamm, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Jakob, Klingenberg,
Lang, Linneweh, Löhr, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes,
Neubauer, Niessing, Petry, Rohen, Schiff, Schleyer, Schmid,
Schürmann, Schultheiß, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess,
Spiegelberg, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Würterle.

in Erlangen:

Bauer, Gall, Keidel, Leonhardt, May, Müller, Scheiffarth,
Trincker, Weisbaar.

in Düsseldorf:

Derra, Dibbelt, Effert, Grosse-Brockhoff, Hüter, Meessen,
Flester, Poche, Schild, Schlipköter.

